

Université de Montréal  
Faculté de Médecine  
Département de Microbiologie et Immunologie

**Mécanismes moléculaires de la réplication préférentielle du VIH-1  
dans les cellules à polarisation Th1Th17 *versus* Th1 : rôle de PPARG  
dans la régulation négative de la réplication virale**

Travail réalisé par  
**Annie Bernier**

sous la direction scientifique de Dre Petronela Ancuta

Laboratoire Chimiotiques et VIH-1  
CRCHUM, Hôpital Saint-Luc

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures  
en vue de l'obtention du diplôme de maîtrise en  
microbiologie et immunologie

Montréal, novembre 2012

© Annie Bernier 2012

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé  
**Mécanismes moléculaires de la réplication préférentielle du VIH-1  
dans les cellules à polarisation Th1Th17 *versus* Th1 : rôle de PPARG  
dans la régulation négative de la réplication virale**

présenté par  
**Annie Bernier**

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Sylvie Lesage, Ph.D.**  
**Président-rapporteur**

**Andrés Finzi, Ph.D.**  
**Membre du jury**

**Petronela Ancuta, Ph.D.**  
**Directrice de recherche**

# TABLE DES MATIÈRES

<b>Table des matières des figures et des tableaux .....</b>	<b>VI</b>
Figures .....	VI
Tableaux .....	VI
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>VII</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>IX</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1 VIH : Caractéristiques générales.....	1
1.2 Génome viral du VIH-1 .....	3
1.2.1 Gènes structuraux .....	3
1.2.2 Gènes accessoires .....	3
1.3 Cellules cibles du VIH-1 .....	4
1.4 Cycle de réplication du VIH-1 .....	5
1.4.1 Phase précoce.....	6
1.4.2 Phase tardive.....	6
1.5 Pathogenèse de l'infection à VIH-1 .....	7
1.5.1 Phases cliniques.....	7
1.5.1.1 Phase aiguë .....	8
1.5.1.2 Phase chronique .....	9
1.5.1.3 Phase SIDA.....	9
1.5.2 Établissement de la latence .....	10
1.5.3 Réponse immunitaire contre le VIH-1 .....	11
1.5.3.1 Immunité innée .....	12
1.5.3.2 Immunité adaptative .....	12
1.6 Traitement de l'infection à VIH-1 .....	14
1.7 Activation des lymphocytes T CD4+ .....	16
1.7.1 Synapse immunologique.....	17
1.8 Transmission du VIH-1 de cellule à cellule .....	18
1.8.1 Synapse infectieuse.....	19
1.8.2 Synapse virologique.....	20
1.8.3 Récepteurs de chimiokines .....	20
1.8.3.1 Récepteur de chimiokines CXCR6 .....	22
1.9 Hétérogénéité fonctionnelle des lymphocytes T CD4+ .....	23
1.9.1 Marqueurs de cellules T auxiliaires .....	23
1.9.2 Th1 .....	25
1.9.3 Th2.....	26
1.9.4 Th17.....	27
1.9.5 Th1Th17 .....	28
1.10 Facteurs influençant la permmissivité au VIH .....	28
1.10.1 Voie de signalisation NF-κB .....	30
1.10.2 TREX1 .....	31
1.10.3 Facteurs de restriction.....	32
1.10.3.1 APOBEC3G.....	32
1.10.3.2 TRIM5α et TRIM22 .....	33
1.10.3.3 Tétherine .....	34

1.10.3.4 SAMHD1 .....	35
<b>2. Hypothèse et objectifs .....</b>	<b>36</b>
<b>3. Matériel et méthodes.....</b>	<b>37</b>
3.1 Isolation des cellules mononuclées du sang périphérique .....	37
3.1.1 Obtention de leucaphérèses .....	37
3.1.2 Isolation des PBMC par gradient de Ficoll.....	37
3.2 Tri des cellules T CD4+ mémoires par sélection négative à l'aide de billes magnétiques .....	37
3.3 Tri des cellules T CD4+ mémoires CCR6+ et CCR6- par double sélection à l'aide de billes magnétiques.....	38
3.4 Cytométrie en flux.....	38
3.4.1 Analyse phénotypique par cytométrie en flux multicolours .....	39
3.4.2 Tri des cellules Th1, Th1Th17 et Th17 par FACS .....	40
3.5 Culture et stimulation des lymphocytes T CD4+ .....	44
3.6 Analyse du transcriptome par biopuce Affymetrix .....	44
3.6.1 Analyses statistiques .....	45
3.6.2 Analyses fonctionnelles .....	46
3.6.2.1 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) et Gene Ontology (GO) .....	46
3.6.2.2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) .....	46
3.7 RT-PCR quantitative en temps réel par SYBR Green .....	47
3.8 Agoniste et antagoniste de PPAR $\gamma$ .....	48
3.9 Agonistes d'Ahr.....	48
3.10 Mesure de la prolifération cellulaire : méthode de la dilution de la CFSE .....	49
3.11 Détection de cytokines par ELISA .....	49
3.12 Production de stocks viraux à partir de plasmides .....	50
3.12.1 Culture des cellules 293T .....	50
3.12.2 Transfection à l'aide du Fugene et récolte des virions .....	50
3.13 Souche de VIH-1 utilisée et infection.....	51
3.14 Détection de la protéine p24 du VIH par ELISA .....	51
3.15 PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral du VIH-1 .....	52
3.16 Interférence ARN .....	54
3.17 Technique de Bradford.....	55
3.18 Immunobuvardage.....	55
3.19 Microscopie confocale à fluorescence.....	56
3.20 Statistiques .....	58
<b>4. Résultats.....</b>	<b>59</b>
4.1 Permissivité à l'infection par le VIH-1 des cellules T CD4+ à profil de polarisation Th1Th17 <i>versus</i> Th1 .....	59
4.2 Étude de l'expression différentielle des gènes au niveau du génome entier par biopuce ADNc des lymphocytes T CD4+ à profil Th1Th17 <i>versus</i> Th1 .....	61
4.2.1 Analyses par Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) et Gene Ontology (GO) .....	67
4.2.2 Classification par fonction biologique <i>via</i> Gene Ontology .....	67
4.2.2.1 Molécules d'adhésion, cytokines et chimiokines .....	67
4.2.2.2 Réponses inflammatoire et immune .....	68



4.2.2.3	Différenciation et transcription .....	69
4.2.2.4	Prolifération et cycle cellulaire .....	70
4.2.2.5	Cytosquelette .....	70
4.2.2.6	Apoptose et réponse au stress .....	70
4.2.2.7	Signaux de transduction.....	71
4.2.2.8	Protéolyse.....	71
4.2.3	Analyses par Ingenuity Pathway Analysis (IPA) .....	76
<b>4.3</b>	<b>Validation de l'expression différentielle des gènes dans les cellules Th1Th17 <i>versus</i> Th1.....</b>	<b>84</b>
<b>4.4</b>	<b>Rôle de PPAR<math>\gamma</math> dans l'infection par le VIH-1 .....</b>	<b>88</b>
4.4.1	La rosiglitazone est un agoniste de PPAR $\gamma$ dans les cellules T CD4+ mémoires .....	88
4.4.2	L'activation de la voie PPAR $\gamma$ inhibe la réplication du VIH dans les cellules T CD4+ mémoires totales et dans les cellules à polarisation Th1Th17.....	89
4.4.3	Rôle de PPAR $\gamma$ dans la réponse immunitaire .....	91
<b>4.5</b>	<b>Rôle d'ARNTL et AhR dans l'infection par le VIH-1 .....</b>	<b>98</b>
4.5.1	L'activation de la voie AhR augmente la réplication du VIH dans les cellules T CD4+ mémoires	98
<b>5.</b>	<b>Discussion, conclusions et perspectives .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1</b>	<b>Sommaire des résultats.....</b>	<b>103</b>
<b>5.2</b>	<b>Analyse du transcriptome des lymphocytes Th1Th17 <i>versus</i> Th1 .....</b>	<b>105</b>
5.2.1	Mécanismes de la réplication différentielle du VIH dans les cellules Th1Th17 <i>versus</i> Th1 .....	106
<b>5.3</b>	<b>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR<math>\gamma</math>) .....</b>	<b>109</b>
5.3.1	PPAR $\gamma$ est différemment exprimé dans les cellules Th1Th17 <i>versus</i> Th1 .....	111
5.3.2	L'activation de PPAR $\gamma$ inhibe la réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4+ mémoires .....	111
5.3.3	Effet anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$ .....	113
5.3.4	PPAR $\gamma$ est un régulateur négatif de la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4+ .....	113
<b>5.4</b>	<b>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (ARNTL) .....</b>	<b>115</b>
5.4.1	Aryl hydrocarbon receptor (AhR) .....	116
5.4.2	L'activation d'AhR augmente la réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4+ mémoires .....	117
<b>5.5</b>	<b>Conclusions générales et perspectives .....</b>	<b>119</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliographie .....</b>	<b>121</b>
<b>7.</b>	<b>Annexe.....</b>	<b>144</b>
7.1	Figures supplémentaires – Section 4.3 .....	144
7.2	Liste des présentations et des prix de présentations .....	146
7.3	Résumé de présentation et affiche présentée à la 19 <sup>e</sup> Conférence sur les rétrovirus et les infections opportunistes (CROI 2012), Seattle, WA, États-Unis .....	147
7.4	Résumé de présentation et affiche présentée à la Journée SIDA et Maladies Infectieuses du FRSQ, 2012, Montréal, Qc, Canada .....	149

## TABLE DES MATIÈRES DES FIGURES ET DES TABLEAUX

### FIGURES

Figure 1. Schéma organisationnel du VIH.....	2
Figure 2. Structure de l'ADN proviral du VIH-1 .....	3
Figure 3. Cycle de réplication du VIH.....	5
Figure 4. Phases cliniques de l'infection à VIH-1 .....	8
Figure 5. Caractéristiques de quatre sous-populations de lymphocytes T auxiliaires .....	25
Figure 6. Rôle des facteurs de dépendance du VIH dans le cycle de réplication viral .....	30
Figure 7. Stratégie d'isolation des cellules à profil Th1Th17 et Th1 par cytométrie en flux .....	42
Figure 8. Analyse du transcriptome par biopuce Affymetrix .....	45
Figure 9. Permissivité des cellules à profil Th1Th17 et Th1 à l'infection par le VIH-1.....	60
Figure 10. Analyse par biopuce de l'expression des gènes au niveau du génome entier .....	63
Figure 11. Fonctions biologiques et voies de signalisation déterminées par <i>GSEA</i> .....	73
Figure 12. Fonctions biologiques des gènes classées par <i>GO</i> .....	74
Figure 13. Voies canoniques et réseaux moléculaires déterminés par <i>IPA</i> .....	79
Figure 14. Validation de l'expression différentielle des gènes d'intérêt.....	86
Figure 15. Validation de l'expression différentielle de PPAR $\gamma$ par microscopie confocale.....	87
Figure 16. Validation des effets de la RGZ et du T007907 sur l'expression de PPAR $\gamma$ .....	93
Figure 17. Effet de l'activation de la voie PPAR $\gamma$ sur la susceptibilité à la réplication du VIH .....	94
Figure 18. Effet de l'inhibition de PPAR $\gamma$ par ARN interférence sur la réplication du VIH .....	95
Figure 19. Effets de la RGZ sur la viabilité, la prolifération et l'expression de CD4 et CCR5 .....	96
Figure 20. Effet de l'activation de PPAR $\gamma$ sur la production d'IL-17 et IFN- $\gamma$ .....	97
Figure 21. Effet de l'activation d'Ahr sur la susceptibilité à la réplication du VIH .....	100
Figure 22. Effet de l'inhibition d'Ahr par ARN interférence sur la réplication du VIH .....	101
Figure 23. Effet du TCDD/FICZ sur la viabilité, la prolifération et l'expression de CD4 et CCR5 .....	102
Figure 24. Modèle proposé pour l'inhibition de la réplication du VIH par l'activation de PPAR $\gamma$ .....	114
Figure 25. Modèle proposé du rôle d'Ahr et ARNTL dans la régulation de la réplication du VIH .....	119
Figure S1. Niveaux d'expression du gène ISG20 dans les cellules Th1Th17 <i>versus</i> Th1 .....	144
Figure S2. Niveaux d'expression du gène Ahr dans les cellules Th1Th17 <i>versus</i> Th1 .....	145

### TABLEAUX

Tableau 1. Caractéristiques des cytomètres en flux LSR II et BD Aria (Becton Dickinson).....	39
Tableau 2. Anticorps et fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux.....	40
Tableau 3. PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral du VIH-1 .....	54
Tableau 4. Anticorps utilisés pour les expériences d'immunobuvardage .....	56
Tableau 5. Anticorps et fluorochromes pour les expériences de microscopie confocale .....	57
Tableau 6A. Gènes d'intérêt exprimés à la hausse dans les cellules Th1Th17 <i>versus</i> Th1.....	65
Tableau 6B. Gènes d'intérêt exprimés à la baisse dans les cellules Th1Th17 <i>versus</i> Th1 .....	66

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acs, anticorps  
ADN, acide désoxyribonucléique  
ADNc, ADN complémentaire  
AhR, *Aryl hydrocarbon Receptor*  
APOBEC3G, *Apoplipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G*  
ARN, acide ribonucléique  
ARNi, ARN interférent  
ARNm, ARN messenger  
ARNT, *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*  
ARTNL, *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like*  
BSA, *Bovine Serum Albumin*  
BST2, *Bone marrow stromal cell antigen 2*  
CFSE, *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*  
CMH, complexe majeur d'histocompatibilité  
CMV, cytomégalovirus  
CPA, cellule présentatrice d'antigène  
CXCR, *Chemokine C-X-C motif Receptor*  
CYP450, cytochrome P450  
DC, cellule dendritique  
DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMSO, diméthylsulfoxyde  
EDTA, acide éthylène diamine tétracétique  
e.g., *exempli gratia*  
FACS, *Fluorescence-Activated Cell Sorting*  
FBS, *Fetal Bovine Serum*  
FC, *Fold-change*, facteur de changement  
FDR, *False Discovery Rate*  
FICZ, 6-formylindolo[3,2-b]carbazole  
GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissues*  
GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*  
GO, *Gene Ontology*  
HDAC, *Histone Deacetylase*  
HRP, *Horseradish peroxidase*  
HTLV, *Human T-Lymphotropic Virus*  
i.e., *id est*  
IFN, interféron  
IgG, immunoglobuline de type G  
IL, interleukine  
IPA, *Ingenuity Pathway Analysis*  
ISG20, *Interferon-Stimulated Gene 20*  
LBP, *Ligand-binding pocket*  
LTR, *Long Terminal Repeat*  
LNTP, *Long-Term Nonprogressor*  
LPS, lipopolysaccharide

MACS, *Magnetic Activated Cell Sorting*  
 MDDC, *Monocyte-Derived Dendritic Cells*  
 NIH, *National Institute of Health*  
 NF- $\kappa$ B, *Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*  
 NK, *Natural Killer*  
 PBMC, *Peripheral Blood Mononucleated Cells*  
 PBS, *Phosphate-Buffered Saline*  
 PPAR $\gamma$ , *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*  
 PPT, *Polypurine Tracts*  
 Rev, *Regulator of Virion expression*  
 RGZ, *Rosiglitazone*  
 RPMI, *Roswell Park Memorial Institute*  
 RXR, *récepteur X des rétinoïdes*  
 R5, CCR5  
 R6, CCR6  
 SAMHD1, *SAM domain and HD domain-containing protein 1*  
 SET, *Suppressor of variegation, Enhancer of zeste, and Trithorax*  
 SI, *synapse immunologique*  
 SIDA, *syndrome d'immunodéficience acquise*  
 SV, *synapse virologique*  
 Tat, *Trans-Activator of Transcription*  
 T<sub>CM</sub>, *T centrales mémoires*  
 TCDD, *2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine*  
 T<sub>EM</sub>, *T effectrices*  
 Th, *T helper*  
 TLR, *Toll-like receptor*  
 T<sub>N</sub>, *T naïves*  
 TNF, *Tumor necrosis factor*  
 TMB, *tétraméthylbenzidine*  
 TREX1, *Three prime repair exonuclease 1*  
 TRIM5 $\alpha$ , *Tripartite Motif-containing protein 5, isoform alpha*  
 TZD, *thiazolidinédiones*  
 Vif, *Viral Infectivity Factor*  
 Vpr, *Viral Protein R*  
 Vpu, *Viral Protein U*  
 Vpx, *Viral Protein X*  
 VIH, *virus de l'immunodéficience humaine*  
 SIV, *virus de l'immunodéficience simienne*  
 WT, *Wild Type*  
 X3, CXCR3  
 X4, CXCR4  
 $\alpha$ , *alpha*  
 $\beta$ , *bêta*  
 $\gamma$ , *gamma*

## RÉSUMÉ

Les cellules T CD4<sup>+</sup> humaines sont hétérogènes du point de vue de la permissivité à l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1). Notre laboratoire a préalablement démontré que les cellules Th1 à phénotype CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> sont relativement résistantes à l'infection par le VIH-1 alors que les cellules Th1Th17 à phénotype CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> y sont hautement permissives. La réplication du VIH dépend de plusieurs facteurs cellulaires de restriction ou de permissivité agissant à différentes étapes du cycle viral. Toutefois, malgré plusieurs avancées, la compréhension des voies de signalisation cellulaire impliquées dans la régulation de la réplication du VIH est encore limitée. L'objectif majeur de ce projet de maîtrise est de caractériser les mécanismes moléculaires de la permissivité et de la résistance au VIH respectivement dans les cellules Th1Th17 et Th1. Ce mémoire est divisé en quatre parties qui visent: (i) l'identification des voies canoniques et des fonctions biologiques différemment régulées dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 par l'analyse de leur transcriptome au niveau du génome entier; (ii) la validation de l'expression différentielle des gènes d'intérêt identifiés par biopuces au niveau des transcrits et des protéines; (iii) la caractérisation du rôle fonctionnel de certains de ces facteurs (i.e., PPAR $\gamma$ , AhR) sur la réplication du VIH dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1; et (iv) l'identification du niveau auquel ces facteurs interfèrent avec le cycle de réplication du VIH. Nos résultats d'analyse du transcriptome du génome entier par *Gene Set Enrichment Analysis* et *Ingenuity Pathway Analysis* indiquent que les cellules à profil Th1Th17 sont plus susceptibles à l'activation cellulaire et à l'apoptose, favorisent plus l'inflammation et expriment moins fortement les gènes liés à la dégradation protéosomale comparé aux cellules à profil Th1. Ces différences dans la régulation de diverses voies et fonctions biologiques permettent en partie d'expliquer la susceptibilité à l'infection par le VIH dans ces cellules. Nous avons ensuite confirmé l'expression différentielle de certains gènes d'intérêt dans les cellules Th1Th17 (CXCR6, PPAR $\gamma$ , ARNTL, CTSB, PTPN13, MAP3K4) *versus* Th1 (SERPINB6, PTK2) au niveau de l'ARNm et des protéines. Finalement, nous avons démontré le rôle des facteurs de transcription PPAR $\gamma$  et AhR dans la régulation de la réplication du VIH. L'activation de la voie PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone induit la diminution importante de la réplication du VIH dans les cellules T CD4<sup>+</sup>, alors que l'activation de la voie AhR par les ligands exogènes TCDD et FICZ augmente de façon significative la réplication virale. Nous

proposons que la voie PPAR $\gamma$  agit comme un régulateur négatif de la réplication du VIH dans ces cellules, en interférant avec la polarisation Th17 et probablement en inhibant l'activité transcriptionnelle du facteur NF- $\kappa$ B. Les rôles des formes nucléaires *versus* cytoplasmiques du récepteur Ahr semblent être diamétralement opposés, dans la mesure où l'interférence ARN contre AhR s'associe également à l'augmentation de la réplication virale. Il est ainsi possible que la forme cytoplasmique d'AhR, connue par son activité E3 ligase, participe à la dégradation protéosomale des particules virales. Le mécanisme par lequel le AhR nucléaire *versus* cytoplasmique interfère avec la réplication virale est en cours d'étude au laboratoire. Cette étude représente la première caractérisation de l'expression différentielle de gènes au niveau du génome entier de sous-populations T CD4<sup>+</sup> permissives *versus* résistantes à l'infection par le VIH. Nos résultats identifient de nouvelles cibles moléculaires pour de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à limiter la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires.

**Mots clés:** VIH-1, cellules T CD4<sup>+</sup>, Th1Th17, Th1, biopuces ADNc, PPAR $\gamma$ , AhR

## ABSTRACT

Human CD4<sup>+</sup> T cells are heterogeneous in terms of permissiveness to infection by the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Our laboratory previously demonstrated that Th1 cells (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> phenotype) are relatively resistant to infection, whereas Th1Th17 cells (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> phenotype) are highly permissive to HIV-1. HIV replication depends on several cellular restriction or permissiveness factors acting at different stages of the viral life cycle. However, despite several advances, our knowledge on signaling pathways involved in HIV replication is still limited. The main objective of this MSc degree project is to characterize the molecular mechanisms of permissiveness and resistance to HIV in Th1Th17 and Th1 cells respectively. This thesis is divided into four parts, aiming at : (i) the identification of canonical pathways and biological functions differentially regulated in Th1Th17 vs Th1 cells through the analysis of their whole genome transcriptome; (ii) the validation of differential expression of relevant genes identified by microarrays at mRNA and protein levels; (iii) the characterization of the functional role of some of these factors (i.e. PPAR $\gamma$ , AhR) on HIV replication in Th1Th17 versus Th1 cells; and (iv) the identification of the level at which these factors interfere with the HIV replication cycle. Our analysis of the large sets of microarray data by *Gene Set Enrichment Analysis* and *Ingenuity Pathway Analysis* indicate that Th1Th17 compared to Th1 cells are more susceptible to cell activation and apoptosis, promote superior inflammation and express at low levels genes related to the proteosomal degradation. These differences in the regulation of various biological functions and pathways can partly explain the susceptibility to HIV infection in these cells. We then confirmed the differential expression of some genes of interest in Th1Th17 (CXCR6, PPAR $\gamma$ , ARNTL, CTSH, PTPN13, MAP3K4) versus Th1 (SERPINB6, PTK2) cells at mRNA and protein levels. Finally, we demonstrated the role of the transcription factors PPAR $\gamma$  and AhR in the regulation of HIV replication. The activation of PPAR $\gamma$  by rosiglitazone induces an important decrease in HIV replication in CD4<sup>+</sup> T cells, while AhR activation by its exogenous ligands TCDD and FICZ promotes viral replication. We propose that the PPAR $\gamma$  pathway acts as a negative regulator of HIV replication in these cells by interfering with Th17 polarization and probably by inhibiting the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B. The role of nuclear *versus* cytoplasmic AhR appears diametrically opposed, since RNA interference against AhR is also associated with a significant increase in HIV replication. It is thus possible

that the cytoplasmic form of AhR, known for its E3 ubiquitine ligase activity, is involved in proteasomal degradation of the viral particles. The mechanism by which the nuclear *versus* cytoplasmic form of AhR interferes with viral replication is being studied in the laboratory. This study represents the first characterization of the differential expression of genes in the entire genome of CD4<sup>+</sup> T subpopulations permissive (Th1Th17) versus resistant (Th1) to infection by HIV. Ours results identify new molecular targets for therapeutic strategies to limit HIV replication in primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes.

**Key words:** HIV-1, CD4<sup>+</sup> T cells, Th1Th17, Th1, cDNA microarrays, PPAR $\gamma$ , AhR



## REMERCIEMENTS

*Je tiens tout d'abord à remercier sincèrement tous ceux et celles qui ont fait un don de sang pour la recherche, car sans eux ce travail serait impossible. Je remercie également les Drs Jean-Pierre Routy et Mohamed-Rachid Boulassel pour avoir fourni les leucaphérèses à notre laboratoire.*

*Je désire ensuite remercier personnellement chaque membre de notre laboratoire pour leur support et leurs enseignements tout au long de ma formation de maîtrise. Un merci tout particulier à Vanessa Sue Wacleche et Annie Gosselin qui m'ont appris beaucoup à mon arrivée au laboratoire, à Dre Patricia Monteiro pour les expériences avec les biopuces, à Dre Aurélie Cleret-Buhot qui m'a grandement assistée dans les expériences de microscopie confocale et, la dernière et non la moindre, à ma directrice de maîtrise et mentor, Dre Petronela Ancuta, pour son encadrement constant, ses précieux conseils et pour sa passion contagieuse pour la recherche et la science.*

*Je me dois aussi de remercier le biostatisticien Jean-Philippe Goulet pour sa collaboration aux analyses des données de biopuces et pour mon apprentissage concernant les outils d'analyses.*

*Il m'est également impossible de ne pas remercier chaleureusement mon entourage; merci à tous mes amis qui m'ont encouragée durant ces deux années et même avant et avec qui j'ai pu partager ma passion. Merci particulièrement à Cat pour toutes ces conversations, en personne et en ligne; merci à Jakie pour l'espace à la page 60 (tel que promis); merci à Alex pour nos visites chez Giovanna; merci à Moka, Rosie et Guinness pour m'avoir aidée à rester zen; merci aux membres de ma famille, montréalaise et magnymontoise, pour leur bons mots malgré la distance et merci à tous les autres que je n'ai pas cités mais qui se reconnaîtront dans ces lignes.*

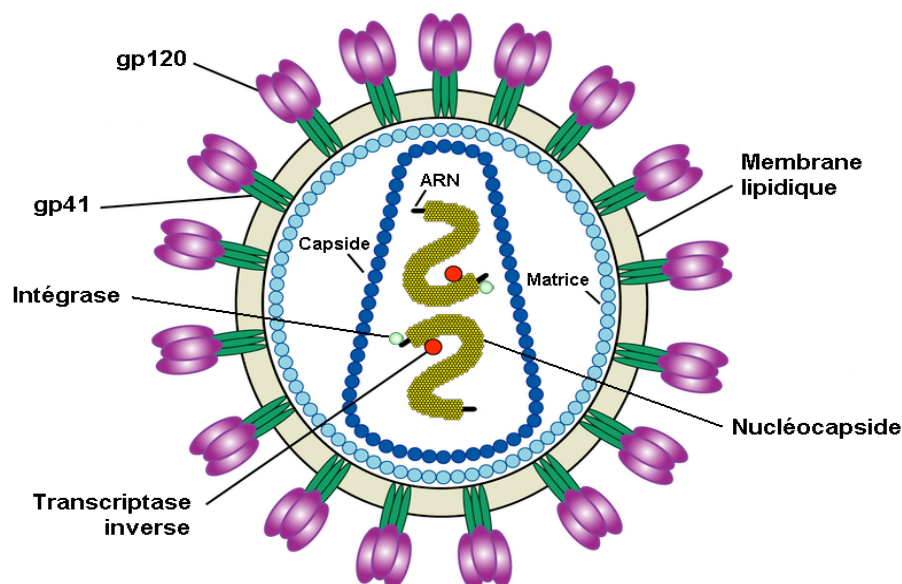
*Finalement, le plus grand des mercis à mes parents et à mon frère car ils sont mes plus grandes inspirations et mes meilleurs supporteurs. Je leur dois ma curiosité et c'est le plus beau cadeau qui soit. Merci.*

## 1. INTRODUCTION

### 1.1 VIH : Caractéristiques générales

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) fait partie de la famille des rétrovirus et du genre des lentivirus. L'infection par le VIH cause le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) qui se caractérise par une diminution progressive du taux de lymphocytes T CD4+ circulants ( $<200$  cellules/ $\mu\text{l}$ ) résultant en une plus grande susceptibilité face aux infections opportunistes (1). C'est en 1981, sur la côte ouest des États-Unis, que les médecins notent une forte incidence de sarcomes de Kaposi et d'infections associées à une diminution des lymphocytes T CD4+ dans la communauté homosexuelle. Le virus responsable est isolé pour la première fois en 1983, à l'Institut Pasteur, par le groupe du Dr Luc Montagnier qui associe le SIDA avec un rétrovirus de la famille des HTLV (*Human T-Lymphotropic Virus*) (2). En 1984, le groupe propose de nommer ce nouveau virus LAV (*Lymphadenopathy-Associated Virus*) (3). Parallèlement, aux États-Unis, le groupe de Robert C. Gallo obtient des résultats similaires et propose plutôt l'appellation HTLV-III (4). En 1986, le nom VIH est finalement proposé par Coffin et ses collègues (5).

Le VIH est un virus d'environ 100nm de diamètre. Les virions sont dits enveloppés puisqu'ils possèdent une double couche phospholipidique externe dérivée de la membrane cellulaire. Les deux protéines de l'enveloppe sont la glycoprotéine transmembranaire gp41 et la glycoprotéine de surface gp120 qui recouvre la première. Le complexe gp41/gp120 est habituellement retrouvé sous forme trimérique. Sous l'enveloppe, une matrice formée de protéines p17 entoure une capsid de forme conique constituée de protéines p24 (Figure 1). À l'intérieur de cette capsid se trouve la nucléocapsid et le génome viral composé de deux copies d'ARN simple brin à polarité positive. Les particules virales contiennent aussi certaines enzymes dont une transcriptase inverse pour la rétro-transcription de l'ARN viral en ADN double brin et une intégrase permettant l'intégration de l'ADN proviral au génome de la cellule infectée (6).



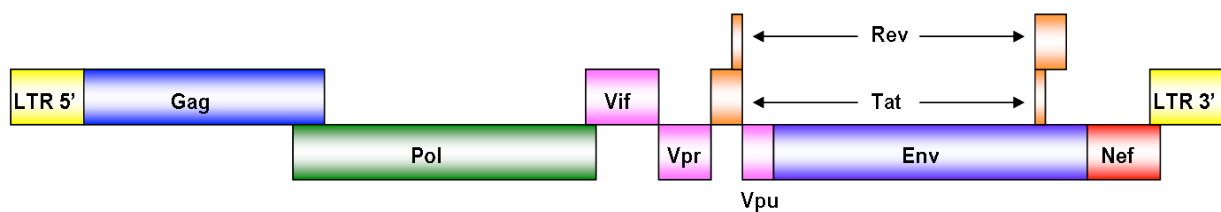
**Figure 1. Schéma organisationnel du VIH.** Adapté du NIH (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, États-Unis).

Le VIH a une grande diversité génétique. Il existe deux types du virus, le type 1 (VIH-1) et le type 2 (VIH-2). Ceux-ci se différencient d'après leur composition génétique, ainsi que leur pathogénicité. Le VIH-2 est moins répandu, moins pathogène et ressemble plus au virus de l'immunodéficience simienne (VIS) des Sooty mangabeys, tandis que le VIH-1 aurait évolué à partir du VIS des chimpanzés (7). Le VIH-1 est celui auquel on attribue la pandémie de SIDA. Il est plus pathogénique et facilement transmissible (8). Le type 1 peut être divisé en quatre groupes : M (*Main*), O (*Outlier*), N (*Non-M, non-O*) et P (9). Le groupe M est le plus répandu actuellement puisqu'il est responsable de près de 90% des cas d'infection par le VIH, en plus d'être présent sur tous les continents, tandis que les groupe O, N et P sont pratiquement limités à l'Afrique centrale. Le groupe M comprend à son tour neuf sous-types majeurs (A, B, C, D, F, G, H, J et K), le sous-type B étant le plus fréquent en Amérique (10).

En 2010, on estime à 1.8 millions le nombre de décès associés au SIDA et à 2.7 millions le nombre de nouvelles infections par le VIH, portant le nombre de personnes séropositives à travers le monde à près de 34 millions. Or, seulement 7.4 millions de personnes reçoivent une thérapie antirétrovirale. Les pays les plus affectés par le SIDA sont en Afrique sub-saharienne, cette région du monde comportant 68% des infections par le VIH alors qu'elle ne représente que 12% de la population mondiale (11).

## 1.2 Génome viral du VIH-1

D'une longueur d'environ 9.2kb, le génome du VIH-1 encode trois gènes structuraux, soit *gag* (groupe d'antigènes), *pol* (polymérase) et *env* (enveloppe), ainsi que des gènes dits accessoires, soit *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev* et *nef*. Les extrémités de l'ADN proviral sont flanquées d'une séquence U3-R-U5 identique appelée LTR (*Long Terminal Repeat*) (Figure 2). Ces séquences sont celles qui permettent au génome proviral de s'intégrer dans le génome cellulaire en interagissant avec l'intégrase virale. Le LTR 5' agit aussi comme un promoteur, régulant l'expression et la latence du virus après intégration (12, 13).



**Figure 2. Structure de l'ADN proviral du VIH-1.** Adapté de Greene et al. (12).

### 1.2.1 Gènes structuraux

Les gènes structuraux du VIH sont traduits sous la forme des précurseurs polyprotéiques Gag-Pol et Env. Après le clivage du précurseur Gag-Pol, Gag doit être à nouveau clivé lors de la maturation du virion en protéines de la matrice (p17), de la capside (p24), de la nucléocapside (p7) et en protéine p6 impliquée dans le bourgeonnement des virions (14). Le précurseur Pol correspond à trois enzymes virales essentielles, soit la protéase, l'intégrase et la transcriptase inverse. La transcriptase inverse permet la rétrotranscription de l'ARN viral en ADN, alors que l'intégrase permet l'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire. La protéase est responsable du clivage des polyprotéines en protéines fonctionnelles lors de la maturation des virions. Le gène *env* résulte en la polyprotéine précurseuse Env ou gp160 qui est aussi clivée en glycoprotéines membranaires gp120 et gp41 (12, 15) grâce à une protéase cellulaire nommée furine (16).

### 1.2.2 Gènes accessoires

Les gènes accessoires permettent le contrôle de l'expression des autres protéines virales et sont les premières produites par la traduction des ARNs épissés. La protéine Tat (*Trans-Activator of Transcription*) agit sur la polymérase ARN cellulaire pour empêcher sa complexion

avec des inhibiteurs de l'élongation, la rendant ainsi plus active et augmentant la transcription des ARNm du virus (17, 18). Rev (*Regulator of Virion expression*) permet l'exportation des ARNs non épissés vers le cytoplasme pour la production des protéines tardives et pour l'encapsidation du génome dans les nouveaux virions (19). Les gènes accessoires participent aussi à une modulation très fine de l'interaction entre le virus et la cellule hôte *via* les protéines Nef et Vpu. Nef (*Negative regulatory factor*) est la protéine accessoire la plus immunogène du VIH et est nécessaire à la réplication du VIH *in vivo* ainsi qu'à la progression de la maladie. Cette protéine multifonctionnelle conduit à l'endocytose et à la dégradation des molécules de surfaces cellulaires CD4 et CMH afin d'éviter la reconnaissance par le système immunitaire, d'empêcher la réinfection de cellules déjà infectées et pour prévenir l'incorporation du CD4 aux virions bourgeonnant, ce qui les rendrait moins infectieux (20). La protéine Vpu (*Viral protein U*) est unique au VIH de type 1. Elle conduit à la dégradation des protéines CD4 nouvellement synthétisées au réticulum endoplasmique et favorise la libération des virions de la cellule infectée (21). La protéine Vpr (*Viral protein R*) permet quant à elle d'augmenter la capacité répliquative du virus en facilitant le transport nucléaire du complexe de préintégration, ainsi qu'en arrêtant le cycle cellulaire en phase G2 (22). Pour finir, la protéine Vif (*Viral Infectivity Factor*) joue un rôle important dans l'infectiosité des particules virales en induisant la dégradation de l'enzyme cytidine désaminase APOBEC3G, un facteur cellulaire qui autrement s'incorporerait dans les virions et pourrait altérer l'ADN viral (23). De plus, il est suggéré que Vif module l'assemblage et la maturation des virions (24).

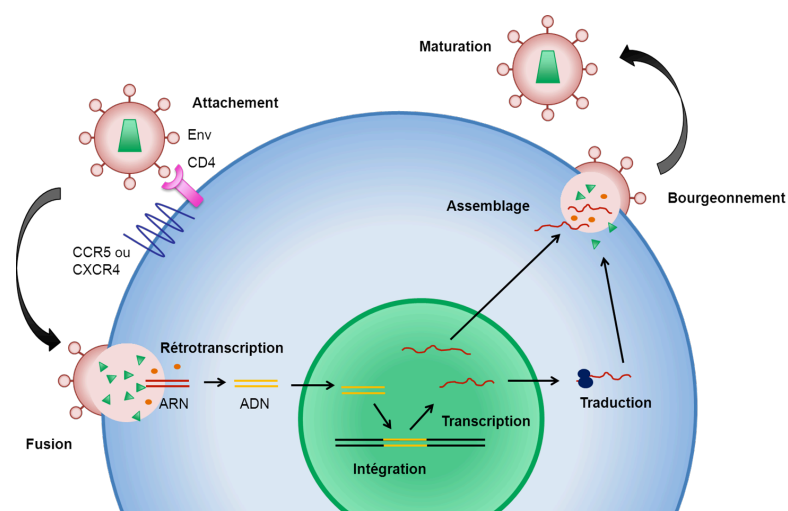
### 1.3 Cellules cibles du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 implique l'interaction de la glycoprotéine de l'enveloppe virale avec la protéine CD4, dite récepteur primaire du virus, qui permet l'attachement puis l'entrée du virion dans la cellule cible (25, 26). Ainsi, le VIH-1 infecte les cellules qui expriment le CD4 à leur surface, c'est-à-dire diverses cellules du système immunitaire, plus précisément les cellules dendritiques (DCs), les macrophages, les monocytes et majoritairement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (27). Les souches virales ont été classées initialement en fonction de leur tropisme pour les macrophages (macrophage (M)-tropiques) versus les cellules T CD4<sup>+</sup> (lymphocyte (T)-tropiques) et aussi en fonction de leur capacité à induire (SI, *syncytium inducing*) ou non (NSI, *non-syncytium inducing*) des syncytia (28). L'infection de ces cellules et leur mort conduit au syndrome de l'immunodéficience associé au VIH. L'identification des

récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 comme des corécepteurs majeurs du VIH-1 nécessaires à l'entrée des virus dans la cellule (29-31) a permis une nouvelle classification des souches virales (28). Ainsi, le VIH peut être classé en trois souches selon son tropisme pour un certain type de corécepteur: souches R5 pour les virus qui utilisent le CCR5, souches X4 pour ceux utilisant le CXCR4 et souches à double tropisme R5/X4 pour les virus pouvant utiliser l'une ou l'autre des molécules. L'interaction avec l'un ou l'autre ou les deux corécepteurs dépend de la séquence de la protéine d'enveloppe du virus. Les souches R5 infectent bien les macrophages, mais aussi les cellules T CD4+ mémoires, ce qui représente une fraction majeure des cellules T CD4+. Les souches R5 sont les plus fréquemment transmises et représentent ainsi la majorité des souches dites fondatrices (ou T/F, transmises/fondatrices) (32), bien que l'efficacité de leur transmission ne semble pas dépendre de leur utilisation du corécepteur R5 plutôt que X4 (33). Les souches X4 apparaissent quant à elles généralement plus tard durant l'infection et permettent l'infection de cellules T CD4+ naïves (34-36).

#### 1.4 Cycle de réplication du VIH-1

Le cycle de réplication du VIH se divise en deux phases, soit la phase précoce et la phase tardive. La phase précoce débute avec l'attachement du virus au niveau de la membrane de la cellule cible et se termine avec l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. La phase tardive représente les étapes subséquentes à partir de la régulation de la transcription de l'ADN proviral, jusqu'au bourgeonnement des nouveaux virions et leur maturation (37).



**Figure 3. Cycle de réplication du VIH.** La phase précoce (à gauche) et la phase tardive (à droite). Adapté de Rambaut *et al.* (38).

### 1.4.1 Phase précoce

Le cycle de réplication virale commence par l'interaction spécifique entre la glycoprotéine gp120 du virus avec la molécule CD4 à la membrane d'une cellule cible (39, 40). Cette interaction induit un changement de conformation de la gp120 (41), exposant un domaine de fixation qui peut alors interagir avec un corécepteur CXCR4 ou CCR5 (42). Un nouveau changement de conformation (43) conduit ensuite à la libération de la gp41 dont le peptide de fusion pénètre la membrane cellulaire (44). Le repli sur elles-mêmes des hélices de la gp41 permet la fusion des membranes virales et cellulaires et donc le relâchement de la nucléocapside dans le cytoplasme (45). Une fois à l'intérieur de la cellule, la nucléocapside se désagrège et relâche les deux brins d'ARN viraux, ainsi que certaines enzymes virales déjà contenues dans le virion. La transcriptase inverse catalyse la rétro-transcription de l'ARN viral simple brin en formant des hybrides ARN-ADN en se servant d'un ARN de transfert (ARNt) cellulaire comme amorce (46). L'activité ribonucléase H de la transcriptase inverse permet du même coup de dégrader entièrement l'ARN servant de matrice, à l'exception de 2 courtes séquences riches en purines appelées PPT (*polypurine tracts*). Ces séquences sont utilisées comme amorces pour la synthèse du second brin d'ADN, en utilisant le premier comme matrice (47, 48). Une des particularités de la transcriptase inverse est aussi de faire beaucoup d'erreurs lors de la synthèse des brins d'ADN, ce qui résulte en une grande variabilité génétique du virus. Lorsque les 2 brins d'ADN viraux complémentaires sont générés, il y a formation du complexe dit de pré-intégration, composé de l'ADN, de l'intégrase, de la protéine Vpr et de plusieurs protéines cellulaires. Ce complexe est transporté vers le noyau par un processus actif et l'intégrase permet l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule, où il est alors appelé provirus (49).

### 1.4.2 Phase tardive

La première étape de la phase tardive correspond à la transcription des ARNm par l'ARN polymérase cellulaire. Ils sont ensuite épissés ou non avant d'être transportés au cytoplasme où ils sont traduits par les ribosomes. Les petits ARNm épissés sont traduits en premier pour produire 3 protéines accessoires : les protéines régulatrices Tat et Rev, ainsi que la protéine Nef. Rev permet ensuite le transport, la stabilisation et la traduction des ARNm non épissés plus longs qui permettent de produire 3 précurseurs protéiques : Gag, Gag-Pol et Env (50). Les diverses protéines virales s'associent et forment des virions autour de 2 copies d'ARN total du

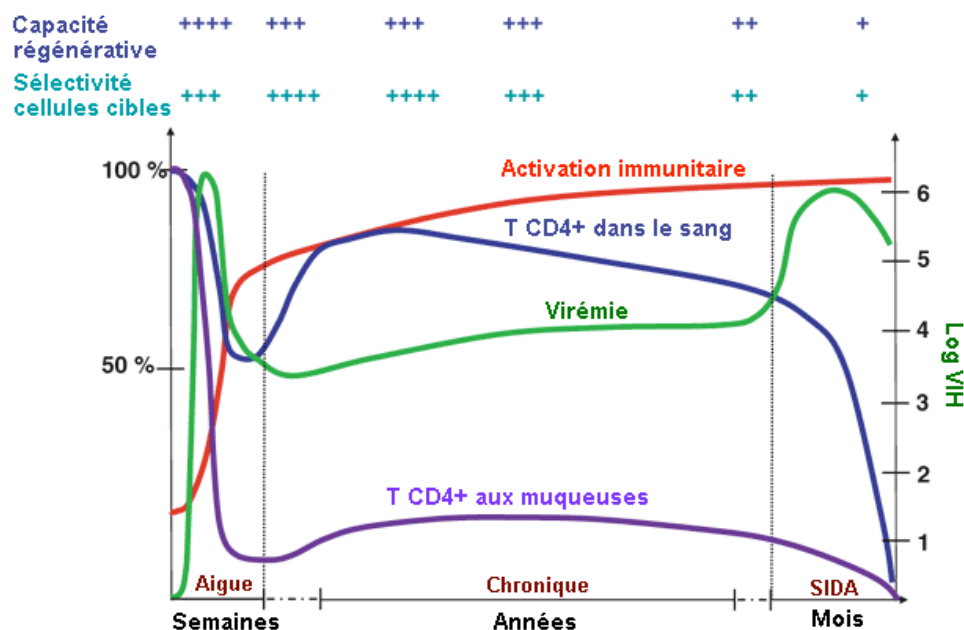
virus. Les protéines virales membranaires, c'est-à-dire gp160 (Env), composées de gp120 et gp41, s'intègrent quant à elles à la membrane cellulaire et sont emportées par les virions lorsqu'ils bourgeonnent à travers la membrane cytoplasmique de la cellule infectée (51). Le bourgeonnement des particules virales est régulé par la protéine p6 du VIH. Cette protéine de seulement 52 acides aminés contient deux domaines dits d'assemblage tardif (*L domains*) qui permettent de recruter les complexes cellulaires ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) (52) qui médient normalement le recyclage des récepteurs de surface cellulaires (14). Les complexes ESCRT interviennent dans le processus d'abscission de la membrane afin de libérer les particules virales de la surface de la cellule infectée (53). La protéine p6 est aussi impliquée dans l'incorporation de la protéine virale Vpr aux virions (54). Finalement, la proximité des précurseurs protéiques Gag (matrice, capsid, nucléocapsid) et Gag-Pol (matrice, capsid, nucléocapsid, protéase, transcriptase inverse et intégrase) dans les virions nouvellement formés et leurs interactions permettent l'activation des protéases virales pour cliver les polyprotéines. Cette étape de maturation est nécessaire à la production de virions infectieux (55, 56).

## **1.5 Pathogenèse de l'infection à VIH-1**

### **1.5.1 Phases cliniques**

L'infection par le VIH-1 induit une importante déplétion des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> qui compromet le fonctionnement du système immunitaire et rend ainsi les sujets infectés plus vulnérables aux infections opportunistes. La pathogenèse de l'infection peut se décrire en trois phases cliniques successives à durées variables : aiguë, chronique et SIDA (Figure 4).





**Figure 4. Phases cliniques de l'infection à VIH-1.** Adapté de Grossman et al. (57) et reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Nature Medicine, copyright 2006.

#### 1.5.1.1 Phase aiguë

L'infection primaire à VIH-1 est caractérisée par une importante réplication virale et une baisse marquée du taux de lymphocytes T CD4+, particulièrement au niveau des tractus gastro-intestinal et reproductif (Figure 4). Cette phase dure quelques semaines et s'accompagne habituellement de symptômes tels fièvre, maux de tête, fatigue et perte de poids (58). Les souches virales détectées lors de la phase aiguë de l'infection sont majoritairement à tropisme R5 (59, 60). Or, les cellules T CD4+ CCR5+ sont hautement permissives au VIH du fait de leur état d'activation. En effet, ces cellules expriment des marqueurs d'activation comme les molécules CD25, CD69 et HLA-DR (61-63). Les protéines virales Nef, Tat, Vpr et Env peuvent aussi contribuer à leur état d'activation indépendamment du récepteur des cellules T (TCR) (64-67). Il faut aussi noter que le VIH peut infecter des cellules T mémoires quiescentes et créer des réservoirs viraux latents persistants à long terme (68) (section 1.5.2).

Les tissus lymphoïdes associés au tractus gastro-intestinal comprennent plus de la moitié du compte total de lymphocytes T CD4+ (69) et parmi ces cellules plus de 50% expriment le récepteur CCR5, comparativement à seulement 15% dans le sang périphérique et les ganglions

lymphatiques (57, 63, 70). La déplétion massive des cellules T CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> des muqueuses se déroule principalement pendant les 2 à 3 semaines suivant l'infection. La mort cellulaire est directement ou indirectement liée à la cytopathologie virale, c'est-à-dire soit directement causée par l'infection de la cellule, soit induite par les cellules NK (*Natural Killer*) (71) et lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> (63). À la fin de la phase aiguë, un contrôle temporaire de la réplication virale via des réponses immunitaires à médiation cellulaire (cellules NK et lymphocytes T CD8<sup>+</sup>) et humorale (lymphocytes B et anticorps) permet un rétablissement partiel du taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en périphérie, mais pas au niveau des muqueuses (57).

#### **1.5.1.2 Phase chronique**

La phase chronique est généralement asymptomatique et s'étend sur plusieurs années marquées par la déplétion progressive des cellules T CD4<sup>+</sup> du sang périphérique (Figure 4). La réplication du VIH demeure persistante et à bas bruit. Le degré d'activation du système immunitaire, caractérisée entre autres par la production accrue de cytokines pro-inflammatoires, permet de prédire la progression de l'infection (72). Le bris d'intégrité du système immunitaire des muqueuses gastro-intestinales qui survient dès la phase aiguë permet la translocation microbienne qui est en partie responsable de cette activation immunitaire persistante (73). Étant donné qu'*in vivo* le VIH n'infecte qu'une petite fraction des cellules T (74), il est probable que ce soit l'activation immunitaire chronique qui soit responsable de la déplétion massive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en induisant un épuisement du métabolisme cellulaire. Cet épuisement s'explique par (i) l'attrition de la population de cellules T mémoires due à l'activation persistante, (ii) l'activation des cellules T naïves devenant alors mémoires, (iii) la déplétion des cellules de réserve à cause de la stimulation récurrente et (iv) la dysfonction de l'approvisionnement en cellules T naïves à partir des sources lymphopoïétiques (63). En effet, chez les sujets atteints par le VIH, la capacité du thymus à générer de nouvelles cellules T naïves est diminuée (75) et les ganglions lymphatiques sont altérés structurellement par des dépôts de collagènes (76), ce qui nuit à la survie et à l'expansion des cellules T CD4<sup>+</sup> (77).

#### **1.5.1.3 Phase SIDA**

Cette dernière phase correspond au syndrome d'immunodéficience acquise et est déclarée lorsque le taux de cellules T CD4<sup>+</sup> dans le sang périphérique descend sous le seuil de 200 cellules/ $\mu$ l (normalement de 500 à 1500 cellules/ $\mu$ l chez les sujets sains) (78). Le stade SIDA

est aussi associé à une importante hausse de la charge virale (Figure 4). Les souches virales à tropisme X4 apparaissent généralement à ce stade de l'infection (63). L'utilisation du récepteur de chimiokines CXCR4 comme co-récepteur d'entrée permet au virus d'infecter une plus grande proportion de cellules T, ce qui résulte en une accélération de la progression de la maladie. De plus, la perte d'intégrité du système immunitaire adaptatif à médiation cellulaire permet aux microorganismes et aux virus normalement à virulence limitée d'infecter plus efficacement les sujets sidéens et de devenir des pathogènes dangereux. Ces infections opportunistes comprennent (i) les infections bactériennes dont la tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), les pneumonies bactériennes et les septicémies; (ii) les infections parasitaires causées par des protozoaires telle la toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*), la leishmaniose et la pneumonie à *Pneumocystis carinii*; (iii) les infections fongiques parmi lesquelles les candidoses et méningites à cryptocoques; (iv) les infections virales associées entre autres au cytomégalo virus (CMV), au virus du papillome humain (VPH) et au virus de l'herpès simplex (VSH); ainsi que (v) les néoplasies dont le sarcome de Kaposi et le lymphome cellulaire squameux (79, 80).

### 1.5.2 Établissement de la latence

La majorité des cellules T CD4<sup>+</sup> infectées par le VIH-1 le sont de façon productive, c'est-à-dire qu'elles produisent et relâchent des virions. Cependant, le VIH crée aussi des réservoirs viraux latents dans les cellules T mémoires quiescentes qui persistent à long terme (27, 68, 81). Dans ces cellules, le génome viral est intégré au génome cellulaire, mais n'est peu ou pas transcrit et l'expression des protéines virales est donc absente ou très faible, empêchant conséquemment la reconnaissance de la cellule infectée par le système immunitaire (82). En 2009, Chomont et collègues ont démontré que les cellules T CD4<sup>+</sup> à phénotype mémoire centrale (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> CD27<sup>+</sup>) et mémoire transitoire (CD45RA<sup>-</sup> CCR7<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup>) forment des réservoirs cellulaires majeurs chez les sujets sous thérapie antirétrovirale et ayant une charge virale plasmatique indétectable (83). Durant la phase asymptomatique chez la personne infectée par le VIH-1, le réservoir viral est évalué comme incluant de 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> cellules (74, 84) et possédant une demi-vie de 44 mois (85). Ainsi, il faudrait environ 70 ans pour éradiquer un réservoir. La latence du VIH implique le recrutement d'enzymes HDACs (histones déacétylases), dont HDAC3 (86), par la sous-unité p50 de NF-κB (*Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) au niveau du promoteur viral LTR (87)

(section 1.10.1). L'état de condensation de la chromatine influe sur l'accessibilité du LTR pour les enzymes cellulaires de transcription de l'ADN et peut limiter la réplication du virus.

Ainsi, une stratégie d'élimination des réservoirs viraux latents consiste en l'administration d'inhibiteurs de HDACs (HDACi), tel l'acide hydroxamique suberolanilide (SAHA) (88). Le SAHA, commercialisé sous le nom de Vorinostat, est un inhibiteur spécifique des HDACs 1, 2 et 3. Un essai impliquant l'administration d'une seule dose de Vorinostat chez 6 patients avirémiques sous thérapie antirétrovirale a montré une augmentation de 3 à 10 fois de l'ARN viral mesuré dans les cellules T CD4<sup>+</sup> quiescentes (89). Une autre cible envisagée pour contrer les réservoirs est le récepteur PD-1 (*Programmed cell death protein 1*). PD-1 est présent à la surface de plusieurs cellules du système immunitaire et son interaction avec son ligand PD-L1 a un rôle dans la régulation négative de la réponse immune (90). Or, l'expression de PD-1 par les cellules T CD4<sup>+</sup> corrèle avec la taille du réservoir viral et l'inhibition de l'interaction PD-1/PD-L1 résulte en une plus grande production virale (91, 92). D'un autre côté, en comparant les génomes viraux du VIH-1 du sous-type B, très susceptible à générer des infections latentes, au sous-type E qui lui établit presque exclusivement des infections productives, Wolschendorf et al. ont récemment identifié une séquence de 15 nucléotides incluse dans le LTR et qu'ils ont nommée LCR (*latency control region*) (93). Des mutations au niveau du LCR permettent d'induire ou d'empêcher la latence. L'identification de cette région et la compréhension future du mécanisme moléculaire impliqué devraient procurer des cibles importantes pour le design de stratégies de réactivation des réservoirs latents.

### **1.5.3 Réponse immunitaire contre le VIH-1**

La dissémination du VIH à partir des sites d'entrée vers les ganglions lymphatiques peut se produire en quelques heures (94). Or, l'apparition d'une réponse immunitaire adaptative contre un pathogène spécifique peut prendre en moyenne de 4 à 5 jours et le plein développement de son efficacité peut nécessiter jusqu'à quelques semaines (82). La réponse dite innée est donc la première déployée pour tenter de limiter la dispersion du virus dans l'organisme par des mécanismes de défense non spécifiques.

### **1.5.3.1 Immunité innée**

Les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules NK et les neutrophiles représentent les composants cellulaires principaux de l'immunité innée (95). Ces cellules vont reconnaître divers motifs liés à des pathogènes (PAMP, *Pathogen-associated molecular patterns*) par un système de récepteurs appelés PRR (*pattern recognition receptors*) dont font partie les TLR (*toll-like receptors*) (96). La détection de la présence d'un pathogène par ces récepteurs induit l'expression de molécules de costimulation à la surface cellulaire et la production de diverses cytokines. Les DCs et les macrophages vont principalement contribuer à l'activation de la réponse adaptative en phagocytant des particules virales pour la présentation antigénique. Les DCs exposées au VIH vont aussi produire des cytokines tel le TNF afin de renforcer l'immunité innée. Les neutrophiles quant à eux sécrètent des peptides antimicrobiens appelés défensines ou HNP (*human neutrophil peptides*) (97) qui ont la capacité d'inhiber la réplication virale en interagissant directement avec les virions ou avec les cellules cibles du VIH (98, 99). De leur côté, les cellules NK ont une fonction cytolytique qui leur permet de lyser les cellules infectées par le VIH qu'elles reconnaissent par leur faible expression des molécules du CMH de classe I (100, 101). L'activité cytolytique des NK est cependant altérée chez les sujets séropositifs avec une forte charge virale (102). Les cellules NK sécrètent aussi des chimiokines ligands de CCR5 (CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$  et CCL5/RANTES) qui compétitionnent pour ce récepteur avec les protéines d'enveloppe du VIH qui doivent s'y lier pour infecter les cellules. L'accès au CCR5 étant restreint, l'entrée du virus dans les cellules cibles est diminuée (95, 103).

### **1.5.3.2 Immunité adaptative**

Le système immunitaire adaptatif est formé de l'immunité à médiation cellulaire (lymphocytes T) et à médiation humorale (lymphocytes B). Les cellules T CD4<sup>+</sup> peuvent être spécifiques entre autres aux protéines d'enveloppe virale ou même aux protéines Nef, Gag et Pol du VIH (104-106). Une fois activés, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> jouent un rôle central dans l'efficacité du système immunitaire adaptatif en aidant à la différenciation des cellules T CD8<sup>+</sup> et en contrôlant l'activation des lymphocytes B (107). Cependant, l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> les rend plus permissifs à l'infection par le VIH et une forte proportion des cellules spécifiques au virus sont ainsi tuées dès la phase aiguë (108, 109). L'activation chronique du système immunitaire causée par l'infection et la translocation microbienne, en plus de la mort

des cellules productivement infectées entraînent la nécessité d'un renouvellement constant des cellules T CD4+ qui finit par nuire à leur homéostasie et causer leur épuisement (63). Durant la phase chronique de la maladie, une perte irréversible des cellules T CD4+ centrales mémoires est d'ailleurs constatée (110).

Une à deux semaines suivant le pic de la virémie, les réponses des cellules T CD8+ spécifiques au VIH permettent le déclin de la charge virale (82, 111, 112). L'efficacité de ces cellules, aussi appelées cellules T cytotoxiques, est un déterminant majeur de la longueur de la période asymptomatique (113). Après activation et différenciation en cellules effectrices, les lymphocytes T CD8+ peuvent lyser les cellules infectées grâce au relâchement d'enzymes cytolytiques (perforine et granzymes A et B) induisant l'apoptose (107). Les cellules T cytotoxiques spécifiques au VIH-1 peuvent aussi, tout comme les cellules NK, sécréter les ligands de CCR5 et donc limiter l'entrée du virus dans ses cellules cibles (114, 115). Toutefois, l'altération de l'intégrité du système immunitaire causée par l'infection à VIH empêche les lymphocytes T CD8+ de compléter leur processus de maturation. Les cellules non différenciées de façon terminale ne produisant pas de perforine, leur activité cytotoxique est compromise (116). La majorité des cellules T CD8+ sont ainsi bloquées à des stades de différenciation ne leur permettant pas de produire ou de sécréter leurs molécules effectrices. De plus, pour demeurer efficace malgré les constantes mutations du virus, de nouvelles réponses cytotoxiques doivent sans cesse être générées, et ce dans un environnement réduit en cellules T CD4+ au fur et à mesure de la progression de la maladie (63). L'épuisement et le blocage dans la différenciation des cellules T CD8+ causent une dysfonction de la réponse cytotoxique qui est associée à la progression de l'infection vers le stade SIDA. Cette inefficacité des réponses immunes dirigées contre le VIH par les cellules T peut entre autres s'expliquer par les effets observés au niveau de certaines molécules dites de régulation négative du système immunitaire dont CTLA4, PD-1 et Tim-3. L'expression de CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*) et PD-1 (*Programmed cell death-1*) est induite suite à la signalisation par le TCR (section 1.7) et régule l'activation cellulaire (117). L'expression de Tim-3 (*T-cell immunoglobulin and mucin domain-containing molecule-3*) est induite par des cytokines dont l'IL-12 (118), et l'interaction de Tim-3 avec son ligand galectine-9 conduit à la mort cellulaire (119). Or, diverses études ont montré une expression plus élevée de CTLA4, PD-1 et Tim-3 au niveau des cellules T spécifiques au VIH, ainsi qu'une corrélation des niveaux d'expression de ces molécules avec la

charge virale et la progression de la maladie (117, 120) en limitant l'activation et la prolifération des cellules spécifiques au VIH en plus de favoriser leur apoptose.

D'un autre côté, les lymphocytes B contrôlent la réponse humorale en produisant une variété d'anticorps neutralisants dirigés contre le VIH. Toutefois, des anticorps spécifiques pour des régions conservées de l'enveloppe virale dont le site d'interaction de la gp210 avec le CD4 sont rarement ou tardivement produits chez les sujets avec progression rapide de la maladie (121, 122). Les mutations au niveau de l'enveloppe virale finissent par rendre les anticorps non efficaces contre les nouveaux virus et les délais nécessaires à la production d'anticorps spécifiques aux nouveaux épitopes ne permettent pas à la réponse humorale de s'adapter suffisamment rapidement (123, 124). Lors de la phase chronique de l'infection, la diminution des taux de lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, l'état général d'activation immunitaire et la pression antigénique finissent par engendrer la dysfonction des cellules B qui génèrent alors de grandes quantités d'anticorps non spécifiques et n'arrivent plus à maintenir l'intégrité de leur mémoire immunitaire (125).

## **1.6 Traitement de l'infection à VIH-1**

Lors de la découverte du VIH dans les années 80, aucun médicament ne permettait de directement contrôler directement l'infection, il s'agissait donc uniquement de traiter les complications liées à l'immunodéficience. Toutefois, en 1987, un inhibiteur de la transcriptase inverse de type nucléosidique a été mis sur le marché sous le nom de Zidovudine/Azidovudine (AZT) comme premier médicament anti-VIH (126, 127). Au milieu des années 90, des inhibiteurs de la protéase du VIH dont le ritonavir et l'indinavir (128) ont été mis sur le marché et inclus dans une stratégie de traitement nommée trithérapie ou HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) consistant en l'administration d'une combinaison de 3 médicaments antirétroviraux, i.e. un inhibiteur de la transcriptase inverse (AZT ou 3TC) et 2 inhibiteurs de la protéase virale (129, 130). Ce traitement a rapidement contribué à augmenter l'espérance de vie des sujets séropositifs. Plus récemment, des antirétroviraux avec de nouvelles molécules cibles ont été commercialisés, dont l'inhibiteur de CCR5 maraviroc (131, 132) et un inhibiteur de l'intégrase nommé raltegravir (133). Les traitements de type HAART permettent généralement un déclin rapide et drastique de la charge virale, parfois sous un niveau détectable (<50 copies d'ARN/ml), en plus de favoriser l'augmentation du taux de cellules T CD4<sup>+</sup> (82, 134). La

reconstitution du système immunitaire est reflétée par une recirculation des lymphocytes T dans le sang périphérique en provenance des tissus lymphoïdes (135, 136) et par un rétablissement des réponses T CD4<sup>+</sup> spécifiques aux pathogènes opportunistes tels que le CMV et *Mycobacterium tuberculosis* (134). L'activation cellulaire chronique associée à l'infection à VIH-1 est aussi considérablement diminuée chez les patients sous HAART (137), ce qui contribue à prolonger la survie des lymphocytes T et à restaurer leur nombre. Malgré tout, la thérapie antirétrovirale actuelle ne permet pas d'éradiquer le virus et la cessation du traitement conduit à une remontée rapide de la charge virale. En effet, le virus continue de persister dans des réservoirs cellulaires sous forme latente, ce qui implique que les patients séropositifs doivent être traités à vie. Or, la nécessité d'un traitement à long terme engage un suivi médical important et favorise le risque d'apparitions de mutations de résistance face aux antirétroviraux (138, 139). Une stratégie d'éradication du VIH devrait donc inclure la réactivation des réservoirs viraux, par exemple grâce à l'utilisation des inhibiteurs de HDACs (section 1.5.2). Ces drogues ont toutefois souvent des effets toxiques aux concentrations nécessaires pour l'activation des réservoirs viraux et manquent de spécificité (89), les effets induits par l'inhibition d'une HDAC n'étant pas limités à l'expression des gènes du VIH, mais régulant aussi l'expression des gènes de l'hôte. Certains autres mécanismes pour activer le réservoir doivent donc être étudiés, notamment l'IL-7 qui permet de réactiver le virus dans une partie des cellules infectées de façon latentes, probablement en favorisant l'activation et la prolifération des cellules T naïves (140). Une autre difficulté afin d'éliminer le réservoir réside dans le fait que plusieurs de ces cellules sont localisées au niveau du cerveau, un réservoir anatomique difficilement pénétrable pour de nombreuses molécules thérapeutiques, notamment à cause de la barrière hémato-encéphalique (141).

Parallèlement à la stratégie HAART, une avenue d'intérêt est le développement d'un vaccin efficace contre le VIH. En 2007, les essais cliniques du vaccin trivalent Gag/Pol/Nef de Merck ont été arrêtés lorsque les résultats ont révélé que la vaccination semblait associée avec un risque accru d'infection par le VIH chez certains patients (142, 143). Ce vaccin est basé sur la modification d'un adénovirus de type 5 qui pourrait être reconnu par des anticorps pré-existants chez un sujet précédemment infecté par ce virus. Or, le groupe de Kremer a montré que lorsque des anticorps contre l'adénovirus 5 sont combinés en culture au vaccin de Merck, il peut y avoir activation de plusieurs lymphocytes T, rendant ces cellules plus permissives à l'infection par le



VIH (144). En 2003, les résultats d'un autre essai clinique sur un vaccin de VaxGen avaient indiqué une protection partielle (145). Nommé AIDSVAX, ce vaccin est constitué de deux protéines gp120 recombinantes du VIH provenant de deux souches différentes. Les études n'ont pas montré de réduction significative de l'infection par le VIH sur le groupe des sujets vaccinés dans son entier, mais ont indiqué une différence significative chez certains groupes, par exemple chez les asiatiques (146). En 2009, le AIDSVAX a été combiné au ALVAC, un vecteur recombinant du virus de la variole du canari, dans le cadre d'un essai clinique en Thaïlande, ce qui a permis d'atteindre un taux de protection de 31.2% (147).

Ces stratégies ont conduit récemment à des études plus approfondies de la caractérisation structurale des anticorps naturels neutralisants le VIH, tel l'anticorps VRC01 dirigé contre le site de fixation de la gp120 au CD4, une région hautement conservée de la gp120 (148). Une étude de Walker et al. parue en 2011 indique que l'utilisation d'un cocktail d'anticorps neutralisants permet la neutralisation d'une grande variété d'isolats viraux, et ce à des concentrations qui devraient s'avérer atteignables par vaccination (149). Des études portant sur des anticorps neutralisant spécifiques contre des régions conservées du VIH-1 sont présentement en cours pour le design d'un vaccin afin de limiter les possibilités d'échappement par mutation du virus (150, 151). Cependant, la façon d'élucider efficacement la production de tels anticorps chez les patients reste à déterminer. Ainsi, l'éradication du VIH-1 nécessitera l'amélioration des stratégies thérapeutiques déjà à l'étude.

### **1.7 Activation des lymphocytes T CD4+**

L'activation des cellules T nécessite trois signaux distincts. Le premier signal est initié par la reconnaissance de peptides antigéniques par le TCR dans le contexte du CMH. La présentation des antigènes implique la capture et la fragmentation de protéines en peptides par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dont les principales sont les cellules dendritiques, les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B (152, 153). Les peptides obtenus sont par la suite présentés par les CPA dans le contexte du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) à la surface cellulaire. Le complexe CMH-peptide peut alors être reconnu par le récepteur des cellules T (TCR) des lymphocytes T naïfs et mémoires. Les complexes peptides-CMH de classe I et de classe II sont respectivement reconnus par les lymphocytes T CD8+ et T CD4+ (154). La reconnaissance antigénique assure que seule une cellule possédant un récepteur

T spécifique à l'antigène sera activée. Or, le TCR exprimé par une cellule T donnée est unique grâce au phénomène de recombinaison somatique, appelée recombinaison V(D)J, qui a lieu lors du développement des cellules T dans le thymus (155). Ces étapes de réarrangements successifs des segments qui font partie de la séquence génomique du TCR résultent en une grande variabilité génétique, notamment du domaine CDR (*complementarity-determining region*) du TCR, région formant l'interface de liaison du complexe CMH-peptide (156). Cette diversité procure aux lymphocytes T un large répertoire de TCR spécifiques à divers pathogènes. Le TCR est physiquement associé au CD3 dont la chaîne invariante  $\zeta$  est primordiale pour relayer le premier signal nécessaire à l'activation des lymphocytes T (157). Le corécepteur CD4 va également se lier au complexe peptide-CMH et aider à la génération du signal (158).

Le second signal essentiel est appelé « signal de costimulation » et est délivré par les CPA via l'expression de molécules de costimulation à la surface cellulaire qui se lient à des récepteurs du côté de la cellule T (159). Les ligands les plus étudiés sont les glycoprotéines CD80/B7-1 et CD86/B7-2 qui interagissent avec le récepteur CD28 (160). L'expression des molécules de costimulation à la surface des CPA est induite par la reconnaissance de motifs particuliers par les récepteurs de type PPRs qui informent ces cellules sur la présence de pathogènes (96). Toutefois, depuis 1999, un nouveau modèle de la régulation du système immunitaire appelé modèle du danger suggère la nécessité d'un troisième signal d'activation. Ce modèle présenté par Matzinger stipule que l'activation des CPA requiert un signal d'alarme provenant de cellules lésées telles celles exposées à des dommages mécaniques, à des toxines ou des pathogènes (161). La conception selon laquelle la réponse immunitaire se monte sur la base de la reconnaissance du soi *versus* le non-soi change ainsi drastiquement. Finalement, suite à l'activation des cellules T stimulées par ces signaux, de nombreuses cytokines sont produites dont entre autres l'IL-2 qui favorise la prolifération cellulaire. Ainsi, l'activation des lymphocytes T entraîne leur expansion clonale et leur différenciation (162).

### **1.7.1 Synapse immunologique**

L'activation des lymphocytes T implique la réorganisation de plusieurs molécules à la surface et dans le cytosol de la cellule T et de la CPA qui interagissent pour former une jonction adhésive et stable appelée synapse immunologique (SI). Cette structure permet la communication entre la cellule T et la CPA en réponse à un antigène spécifique (163). La

formation d'une SI fonctionnelle requiert un réarrangement du cytosquelette et implique la formation de radeaux lipidiques où se localisent plusieurs protéines composantes de la SI (164). La liaison de faible affinité entre LFA-1 sur la cellule T et l'ICAM-1 sur la CPA représente la première interaction entre les 2 cellules. À la suite de la reconnaissance de l'antigène par le TCR, les composantes de la SI s'accumulent en un même endroit, à l'interface des 2 cellules, et un changement de conformation de LFA-1 qui augmente son affinité pour ICAM-1 resserre le contact entre les cellules. La SI est composée de complexes supramoléculaires d'activation (SMAC) que l'on peut diviser en 3 compartiments majeurs : le SMAC central (cSMAC) interne qui comprend les TCR en interaction avec les complexes peptides-CMH, le cSMAC externe qui est composé des molécules de costimulation (CD80/CD86), de leurs récepteurs (CD28) et des molécules nécessaires aux signaux de transduction, et finalement le SMAC périphérique (pSMAC) qui inclut les intégrines LFA-1 et leurs récepteurs ICAM-1, ainsi que la protéine du cytosquelette taline (164, 165). Un quatrième compartiment appelé SMAC distal (dSMAC) peut aussi être identifié et comprend notamment CD45 (166), une phosphatase importante dans le maintien de l'activation des kinases Scr qui sont nécessaires à la transduction du signal par le complexe du TCR (167). Cette partie de la SI pourrait aussi être impliquée dans la séquestration de régulateurs négatifs de l'activation cellulaire (168). Après un certain temps de contact entre la cellule T et la CPA, le TCR est internalisé et l'expression de LFA-1 est diminuée, ce qui déstabilise l'interaction entre les cellules. De plus, l'expression des molécules régulatrices CTLA-1 et PD-1 est augmentée à la surface de la cellule T. CTLA-4 interagit avec CD80 et CD86 avec une plus forte affinité que le CD28 pour envoyer des signaux inhibiteurs à la cellule T, tandis que PD-1 interagit avec son ligand PD-L1 et permet la déphosphorylation de plusieurs molécules de signalisation du TCR pour mettre fin au signal (169). Ainsi, la cellule T et la CPA se détachent et la cellule T activée peut proliférer et se différencier.

### **1.8 Transmission du VIH-1 de cellule à cellule**

L'infection d'une cellule par le VIH peut se faire lorsqu'un virion libre rencontre une cellule cible, mais le virus peut aussi se transmettre par contact de cellule à cellule. Ce mode particulier de transmission représente pour le virus un bon moyen de promouvoir sa propagation et sa réplication et d'atteindre avec plus d'efficacité les sites riches en cellules permissives. Il existe deux formes majeures de transmission du VIH-1 de cellule à cellule, soit la transmission de CPA à cellule T ou de cellule T à une autre cellule T. Ces mécanismes

impliquent la formation de deux types de synapses semblables à la SI : la synapse infectieuse et la synapse virologique (SV). Ces synapses sont définies comme des jonctions adhésives entre cellules qui requièrent la réorganisation du cytosquelette d'actine et dans lesquelles les virus sont efficacement transmis d'une cellule dite « donneuse » à une cellule « receveuse » (170, 171). La synapse infectieuse correspond à la transmission du virus à partir d'une cellule dendritique (DC) vers une cellule T (172), alors que la synapse virologique représente la transmission entre deux cellules T (170).

### **1.8.1 Synapse infectieuse**

Les DCs sont les sentinelles du système immunitaire et ont un emplacement privilégié dans les muqueuses (173). Or, la transmission sexuelle via les muqueuses génitales ou rectales est de loin la voie d'infection la plus commune du VIH-1 (174). Les DCs situées à la porte d'entrée de l'infection jouent donc un rôle essentiel dans la dissémination du VIH-1 en capturant le virus puis en migrant vers les organes lymphoïdes secondaires où logent la majorité des cellules T (175). La lectine de type C (DC-SIGN) est une molécule de surface des DCs qui permet de capter le VIH et de le transporter (176) en plus d'accroître son infectiosité en augmentant l'exposition du site de liaison au CD4 de la protéine d'enveloppe virale (177). Les DCs peuvent aussi internaliser le virus et, bien qu'elles soient enrichies en compartiments pouvant induire la dégradation du VIH notamment pour la présentation antigénique, certains virions demeurent intacts. Une fois au niveau des organes lymphoïdes, les DCs entretiennent des contacts étroits avec les cellules T en formant des synapses immunologiques pour la présentation antigénique et l'activation cellulaire. Lors de cette rencontre, le virus préalablement internalisé par la DC ou demeuré à sa surface est relocalisé vers la jonction entre les 2 cellules. Du côté de la cellule T, les corécepteurs du virus CXCR4 et CCR5 s'accumulent à la synapse, ce qui favorise la dissémination du virus (172). L'interaction entre le virus et DC-SIGN permet aussi l'activation de facteurs cellulaires resserrant la synapse infectieuse et permettant une meilleure transmission virale (178). DC-SIGN peut ainsi favoriser la *trans* infection des cellules T et certaines études indiquent qu'il pourrait également faciliter l'infection en *cis* des DCs (179-181).

En plus de la synapse infectieuse, les DCs peuvent transmettre le virus aux cellules T à l'aide d'élongations cellulaires appelées filopodes (182). Il a d'ailleurs été démontré que le VIH permet d'induire la formation d'extensions membranaires chez les DCs suite à la liaison de

l'enveloppe virale au DC-SIGN (183). La protéine virale Nef pourrait aussi être en partie responsable de l'induction des filopodes (184). Un autre mécanisme de transmission à distance du VIH impliquant des élongations cellulaires plus minces appelées nanotubes a également été découvert chez les DCs, les macrophages et les cellules T (185, 186). Les cellules infectées ou présentant des virions à leur surface peuvent transmettre le virus à plusieurs cellules simultanément *via* les synapses, les filopodes et les nanotubes, formant une structure appelée « poly-synapse » (187).

### **1.8.2 Synapse virologique**

Dans le cas de la synapse virologique à proprement parler, c'est-à-dire de la transmission du virus d'une cellule T à une autre, il est connu que des cellules T infectées par le VIH-1 peuvent rapidement polariser les récepteurs viraux de cellules T non infectées à leur interface suite au contact cellule-cellule (188). En effet, l'interaction de l'enveloppe virale sur une cellule infectée avec le CD4 et le corécepteur CXCR4 sur les cellules non infectées permet le recrutement de plusieurs récepteurs viraux et de LFA-1 en un amas supramoléculaire à la jonction (171). Plus récemment, il a été montré que les molécules d'adhésion intercellulaires (ICAM) 1 et 3 sont aussi enrichies à la SV et permettent, avec LFA-1 la formation de la jonction adhésive de la synapse (189). La transmission du VIH à la SV résulte de la sécrétion de virions dans la synapse par la cellule infectée. Lors de la formation de la SV, le centre d'organisation des microtubules (MTOC, *microtubule organizing center*) de la cellule infectée est réorienté à proximité de la jonction cellule-cellule. Les études suggèrent que le virus utilise ce réseau pour son transport intracellulaire vers la synapse (170, 190). Le mouvement des virions à travers la SV prend ainsi probablement la forme du bourgeonnement des virus dans ou près de la synapse, suivi par leur interaction avec les récepteurs viraux de la cellule non infectée qui sont concentrés à la jonction, ce qui résulte en la fusion à la membrane des cellules cibles (170). L'identification détaillée des molécules et des mécanismes impliqués dans la formation des synapses et de la transmission de cellule à cellule du VIH représente une avenue prometteuse de traitements pour limiter la dissémination du virus.

### **1.8.3 Récepteurs de chimiokines**

Les récepteurs de chimiokines sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires et sont couplés aux protéines G (GPCR, *G-protein coupled receptors*) à leur extrémité C-terminale

intracellulaire. Ils sont nommés en fonction du type de chimiokines qu'ils lient, les deux principaux étant CCR pour l'interaction avec des ligands dont les deux premières cystéines sont adjacentes et CXCR pour ceux dont les chimiokines possèdent un acide aminé entre leurs deux premières cystéines (191). Il y a environ 2.5 fois plus de chimiokines que de récepteurs (192), ce qui implique que certains récepteurs peuvent interagir avec plus d'un ligand (e.g. CCL3, CCL4 et CCL5 pour CCR5). Il y a toutefois aussi des récepteurs qui reconnaissent la même chimiokine (e.g. CCL2 pour CCR2 et CCR4) (193, 194).

La liaison des récepteurs de chimiokines avec leurs ligands induit des signaux intracellulaires qui influencent la migration des cellules et renforcent le signal d'arrêt pour favoriser l'adhésion et la migration transendothéliale (195). Par exemple, afin de capturer des antigènes, les DC immatures vont migrer vers les tissus périphériques enflammés en réponse aux chimiokines CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES, CCL20/MIP-3 $\alpha$  et CXCL8/IL-8 interagissant respectivement avec les récepteurs de chimiokines CCR2, CCR5, CCR6 et CXCR1 exprimés par ces cellules. Toutefois, suite à la maturation des DC, leur profil d'expression des récepteurs de chimiokines change et leur permet plutôt de migrer vers les organes lymphoïdes en réponse aux CCL21 et CCL19, ligands du récepteur CCR7, afin de présenter les antigènes aux cellules T (196, 197). De façon similaire, les récepteurs de chimiokines représentent des marqueurs identifiant les différentes sous-populations de cellules T naïves ou à polarisation et spécificité antigénique distinctes qui leur permettent de migrer vers des sites anatomiques spécifiques (198-200) (sections 1.9.1 à 1.9.5). Entre autres, le récepteur CCR5, aussi co-récepteur du VIH, régule l'infiltration des cellules T dans les intestins, site majeur de la réplication du virus (201).

De plus, les chimiokines et leurs récepteurs peuvent agir comme des molécules de costimulation et favoriser l'activation cellulaire, notamment au niveau de la synapse immunologique (SI). En effet, durant la présentation antigénique, certains récepteurs de chimiokines dont le CCR5 et le CXCR4 sont recrutés à l'interface entre la CPA et la cellule T. Cette séquestration des récepteurs à la SI rend les cellules T moins sensibles aux autres chimiokines du microenvironnement et facilite la stabilité des conjugués CPA-cellule T, résultant en une activation et une prolifération accrue en réponse à l'antigène (202). L'implication du CCR5 et du CXCR4 dans la formation des synapses infectieuse (section 1.8.1) et virologique (section 1.8.2) dans le contexte de l'infection par le VIH augmente aussi la

transmission cellule-cellule du virus. Conséquemment, des stratégies visant à inhiber l'interaction de ces récepteurs avec leurs chimokines ligands ou avec le VIH permettraient (i) de diminuer la migration des cellules cibles vers les sites infectés pour empêcher la propagation du virus; (ii) de diminuer les niveaux d'activation des cellules T et donc leur susceptibilité au VIH; (iii) de diminuer la transmission cellule-cellule et (iv) même d'inhiber l'entrée des virions dans les cellules cibles en empêchant l'interaction des protéines d'enveloppe virale avec ces corécepteurs cellulaires. Le maraviroc, un antagoniste du CCR5, est d'ailleurs utilisé pour le traitement de plusieurs patients infectés par le VIH et permet une diminution rapide de la charge virale (132, 203).

#### **1.8.3.1 Récepteur de chimiokines CXCR6**

CXCR6 (*Chemokine C-X-C motif receptor 6*), aussi appelé Bonzo ou CD186, est un récepteur de chimiokines dont l'interaction avec son ligand, CXCL16, est impliquée dans l'activation et la rétention des cellules CXCR6<sup>+</sup> dans les tissus (204). Le récepteur de chimiokines CXCR6 a été décrit comme un corécepteur mineur du VIH-1 et pourrait aussi participer dans la progression de l'infection par le VIH-1 *via* son rôle de médiateur de l'inflammation (205). L'expression de CXCR6 est régulée de façon coordonnée avec celle du corécepteur CCR5 du VIH sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> activés (204). De plus, le polymorphisme de CXCR6 est associé à une progression lente de la maladie chez les personnes infectées par le VIH (LNTP, *long-term nonprogressors*) (205, 206). L'interaction entre CXCR6 et son ligand CXCL16 pourrait jouer un rôle dans le renforcement des interactions entre lymphocyte T et cellule présentatrice d'antigènes et ainsi contribuer à l'efficacité de la rencontre entre cellules T et DCs. CXCL16 est connu pour promouvoir la dissémination du VIH dans les cellules T CD4<sup>+</sup> (207, 208) et est exprimé dans la médullaire thymique et les plaques de Peyer (209). Il est également constitutivement exprimé sur les DCs CD11c<sup>+</sup> isolées à partir de la rate et des ganglions lymphatiques (210) et par les monocytes CD16<sup>+</sup>, une sous-population de monocytes pro-inflammatoires qui se voit augmenter au cours de l'infection à VIH (211, 212). Les monocytes CD16<sup>+</sup>, mais pas les CD16<sup>-</sup>, sont des précurseurs d'une sous-population de cellules dendritiques uniques qui favorisent la *trans* infection des cellules T CD4<sup>+</sup> en produisant des ligands de CCR3 et CCR4 (211). De la même façon, l'interaction des monocytes CD16<sup>+</sup> avec des lymphocytes T activés *via* CXCL16 et CXCR6 pourrait favoriser la transmission de cellule à cellule du VIH.

## **1.9 Hétérogénéité fonctionnelle des lymphocytes T CD4+**

La réponse immunitaire face à un pathogène particulier doit permettre d'induire des fonctions effectrices spécifiques afin de l'éliminer de l'hôte. Ainsi, suite à la présentation antigénique et à l'activation cellulaire, les lymphocytes T CD4 auxiliaires (Th, *T helper*) peuvent se différencier en diverses sous-populations ou lignées cellulaires effectrices dont font partie les cellules Th1, Th2, Th17, Th1Th17 et Treg (199, 200). Chaque lignée est caractérisée par un profil particulier d'expression de facteurs de transcription, de récepteurs (e.g. récepteurs de chimiokines) et de cytokines lui conférant un rôle précis dans l'établissement et le contrôle de la réponse immune (Figure 5). Par exemple, les cellules Treg (T régulatrices) ont un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire en contrôlant l'amplitude de la réponse des autres cellules effectrices (213).

La différenciation en une sous-population ou une autre dépend grandement de l'environnement cytokinique dans lequel elle a lieu (214), ainsi que de la force de l'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH (215). D'abord décrit comme un processus unidirectionnel et non réversible, la différenciation des cellules Th nécessite en fait un contrôle transcriptionnel impliquant des modifications épigénétiques plus ou moins stables, ce qui résulte en une certaine plasticité des différents profils de polarisation (216). En effet, les changements dans la structure de la chromatine induits par la méthylation ou l'acétylation des histones liées à l'ADN sont étroitement couplés aux profils d'expression géniques (214, 217) et sont influencés par de multiples voies de signalisation cellulaires elle-mêmes régulées par le microenvironnement. Par exemple, des cellules Th17 stimulées par l'IL-12 peuvent se convertir à un profil Th1 et des cellules Th2 mise en présence de TGF- $\beta$  pourraient produire de l'IL-9, une cytokine non associée au profil classique des Th2 (216). Ainsi, l'hétérogénéité fonctionnelle et la plasticité des cellules T sont des déterminants majeurs de la spécificité et de l'efficacité de la réponse immunitaire.

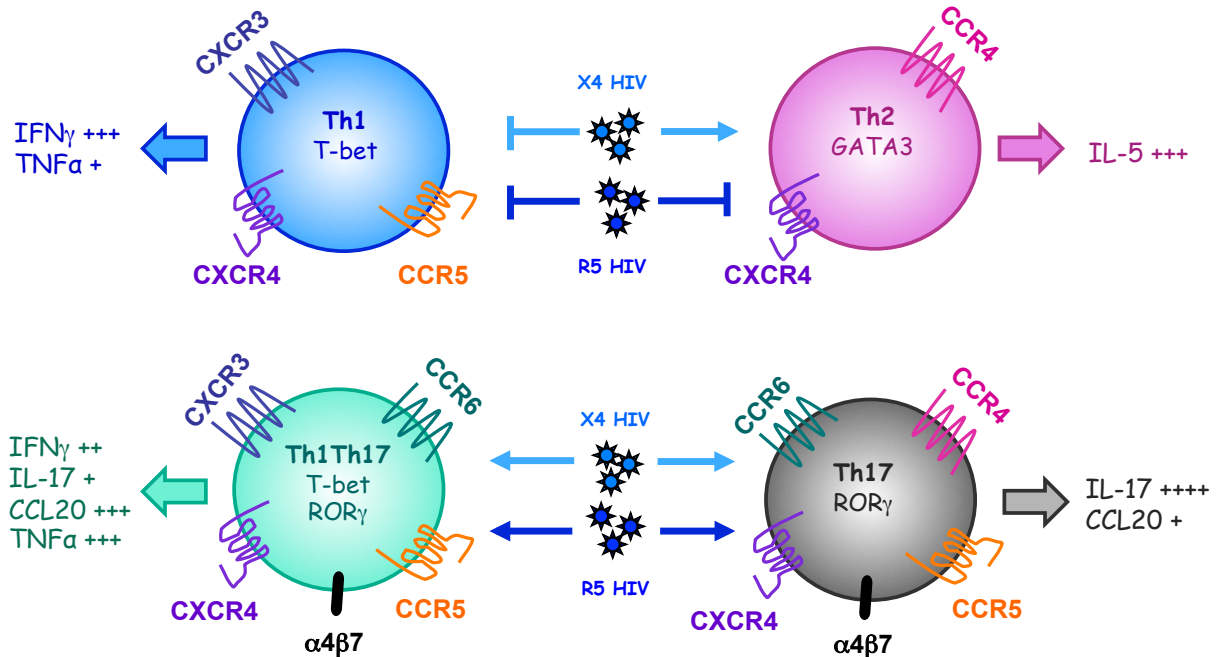
### **1.9.1 Marqueurs de cellules T auxiliaires**

Les cellules T auxiliaires, ou lymphocytes T CD4+, sont d'abord caractérisées par leur expression des glycoprotéines CD3 et CD4, ainsi que par la présence des récepteurs de cellules T (TCR) qui leur permettent de reconnaître les antigènes présentés dans le contexte du CMH de



classe II (voir section 1.7). Toutes les cellules Th expriment aussi le CD28 (à l'exception des cellules différenciées de façon terminale ou sénescents) et le CD45 (isoforme CD45RA pour les cellules naïves et RO pour les cellules mémoires) impliqués dans l'activation cellulaire, ainsi que le CD25, récepteur de l'IL-2, important pour la prolifération (82, 107). L'expression des molécules d'adhésion dépend de l'état d'activation; les cellules quiescentes expriment entre autres la L-sélectine (CD62L) qui favorise la localisation aux organes lymphoïdes (218), alors que les cellules activées expriment plutôt une forme clivée de l'intégrine VLA-4 pour retenir les cellules aux sites d'inflammation (219, 220).

Les récepteurs de chimiokines peuvent aussi représenter des marqueurs de surface pour des sous-populations lymphocytaires à stades d'activation et de différenciation et de fonctionnalités distinctes. Par exemple, le récepteur CCR7 identifie des cellules T naïves ( $T_N$ ) et mémoires centrales ( $T_{CM}$ ) (221) à potentiel de migration vers les ganglions lymphatiques, ceux-ci exprimant de façon préférentielle les ligands de CCR7 (CCL19, CCL21) (222), tandis que les cellules T effectrices ( $T_{EM}$ ) expriment plutôt des marqueurs de migration les dirigeant vers les tissus enflammés (223). De plus, les cellules  $T_{CM}$  ou  $T_{EM}$  à profil de polarisation Th1, Th2, Th17 ou Th1Th17 peuvent être identifiées par leur expression différentielle des récepteurs de chimiokines CCR4, CXCR3 et CCR6 (199, 200) (Figure 5). Ces trois récepteurs sont des marqueurs de migration vers des tissus spécifiques; CCR4 favorise la migration vers la peau (224), alors que CXCR3 et CCR6 favorisent la localisation à l'intestin (225, 226). De plus, il a été démontré par notre groupe que ces sous-populations T auxiliaires présentent différents degrés de permissivité à l'infection par le VIH-1 (227) (Figure 5).



**Figure 5. Caractéristiques de quatre sous-populations de lymphocytes T auxiliaires.** Profil d'expression différentielle des récepteurs de chimiokines, de l'intégrine  $\alpha 4 \beta 7$  et des facteurs de transcription des cellules T auxiliaires Th1, Th2, Th17 et Th1Th17. Les principales chimiokines produites (à l'extérieur), ainsi que la permissivité aux souches X4 et R5 du VIH-1 (au centre) sont aussi indiquées pour chaque sous-population. Adapté de Gosselin et al. (227).

### 1.9.2 Th1

L'IL-12, produit par les DCs en présence de certains pathogènes, induit la production de l'IFN- $\gamma$  par le système immunitaire innée. Ensemble, ces deux cytokines stimulent l'expression du facteur de transcription T-bet dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïves et favorisent leur différenciation en cellules à profil de polarisation Th1 (228, 229). Les cellules Th1 produisent de l'IFN- $\gamma$ , créant une boucle de rétroaction positive pour leur différenciation, de l'IL-2, ainsi que du TNF- $\alpha$  et de la lymphotoxine qui eux favorisent la production de molécules ayant des activités antimicrobiennes (e.g. monoxyde d'azote) (230). En 2004, Rivino et collègues ont identifié le récepteur CXCR3 comme un marqueur de cellules mémoires pré-Th1 sécrétant de l'IFN- $\gamma$ , tandis que le CCR4 a été associé aux cellules pré-Th2 (199). Plus tard, l'expression du CCR6 a aussi été employée afin de distinguer d'autres sous-populations lymphocytaires (200). Les Th1 sont ainsi caractérisées par un phénotype CCR4<sup>-</sup> CXCR3<sup>+</sup> CCR6<sup>-</sup>.

Les cellules Th1 permettent principalement le contrôle des pathogènes intracellulaires (e.g. cytomégalovirus (CMV)) en induisant une réponse à médiation cellulaire, soit en favorisant l'activation des macrophages pour stimuler leur activité microbicide (231) soit en participant à l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (230, 232). Les cellules Th1 peuvent toutefois être impliquées aussi dans l'établissement de la réponse humorale en stimulant la production des anticorps par les lymphocytes B (233). Durant plusieurs années, la réponse Th1 et la production d'IFN- $\gamma$  ont été associées au développement de diverses maladies autoimmunes, dont l'arthrite rhumatoïde. Plus récemment, leur implication dans ces pathologies a toutefois été remise en doute, suggérant plutôt un rôle immunomodulateur de l'IFN- $\gamma$  avec à la fois une activité pro et anti-inflammatoire (233, 234). Malgré une expression modérée des corécepteurs du VIH CCR5 et CXCR4, les cellules à profil Th1 sont relativement résistantes à la réplication du VIH et leur fréquence dans le sang périphérique est maintenue chez des individus infectés chroniquement et sous thérapie antirétrovirale (227).

### **1.9.3 Th2**

La réponse à profil Th2 est généralement impliquée dans la médiation de la défense contre les parasites extracellulaires (e.g. helminthes) (235). La différenciation de ces cellules requiert la présence d'IL-4 et d'IL-2 afin d'induire l'expression du facteur de transcription GATA-3 (236, 237). Une fois différenciées, les cellules Th2 produisent principalement de l'IL-4 et IL-5, mais aussi de l'IL-9, l'IL-10, l'IL-13 et l'IL-25 (238). Les Th2 peuvent stimuler la réponse humorale avec une efficacité de 5 à 10 fois supérieure aux Th1 (233). L'IL-4 participe à une boucle de rétroaction positive dans la différenciation des cellules Th2, en plus de favoriser la commutation de classe des IgE (immunoglobulines E) dans les lymphocytes B (239). L'IL-5 joue un rôle majeur dans le recrutement des cellules éosinophiles pour lutter contre les parasites et l'IL-13 est efficace pour expulser les helminthes. L'IL-25 favorise l'amplification de la réponse Th2 et peut induire diverses chimiokines dont CCL5 et CCL11 qui participent au recrutement des éosinophiles (238). Les Th2 sont cependant impliquées dans l'induction et la persistance de l'asthme et de certaines allergies. Entre autres, l'IL-9 induit la production de mucine par les cellules épithéliales lors de réactions allergiques (240).

Le CCR5 est très faiblement exprimé par les cellules à profil de polarisation Th2, tandis que le CXCR4 est exprimé et ce de façon similaire aux autres sous-populations T auxiliaires.

Conséquemment, ces cellules sont résistantes à l'infection par les souches virales à tropisme R5, mais permissives aux souches à tropisme X4 (Figure 5) et leur fréquence est altérée chez les sujets infectés par le VIH avec ou sans thérapie antirétrovirale (227). Finalement, les cellules Th2 peuvent être identifiées par leur phénotype d'expression des récepteurs de chimiokines, i.e. CCR4<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR6<sup>-</sup> (199, 200). L'expression du CCR3, dont CCL5 et CCL11 font partie des ligands, a également été associée aux cellules de type Th2 (241).

#### 1.9.4 Th17

En 2005, deux groupes de chercheurs indépendants ont identifié des cellules T CD4<sup>+</sup> différant des cellules Th1 et Th2 classiques car ne produisant ni l'IFN- $\gamma$  ni l'IL-4, ces deux cytokines inhibant même la différenciation de cette sous-population qui produit plutôt principalement de l'IL-17 (242, 243). Ces cellules, de ce fait nommées Th17, expriment de faibles niveaux des facteurs de transcription T-bet et GATA-3, se différenciant plutôt sous l'influence du facteur ROR $\gamma$ t (244). L'expression de ROR $\gamma$ t serait induite lorsque l'activation des cellules se fait en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  (245). Certaines études indiquent plutôt que l'IL-1 $\beta$  (246) ou l'IL-21 (247) auraient un rôle important dans la différenciation Th17. En plus de l'IL-17a et IL-17f, les cellules à profil Th17 produisent du CCL20, de l'IL-21 et de l'IL-22. L'IL-17a et IL-17f permettent le recrutement et l'activation des neutrophiles afin de monter une défense principalement dirigée contre les infections fongiques (e.g. *Candida albicans*) ou certaines bactéries extracellulaires (238). Ces deux cytokines stimulent les cellules épithéliales à produire des défensines (peptides antimicrobiens), de l'IL-8 participant à l'activation des neutrophiles et du CCL20 (248-250). Le CCL20 favorise le recrutement des cellules exprimant le récepteur de chimiokines CCR6, dont les Th17, (251), tandis que l'IL-21 renforcerait la réponse Th17 en favorisant la différenciation vers ce profil de polarisation (252). L'IL-23 produit par les DC et les macrophages activés est d'ailleurs aussi important pour le maintien des cellules à profil Th17 après la différenciation (253, 254). Quant à l'IL-22, il stimule les cellules épithéliales à produire une variété de molécules antibactériennes (e.g. lipocaline 2 et défensines) et il peut renforcer les barrières mucosales en stimulant la production de mucine (255, 256).

Les cellules à profil Th17 sont de phénotype CCR4<sup>+</sup> CXCR3<sup>-</sup> CCR6<sup>+</sup> (200). Elles expriment aussi l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7, une molécule qui permet l'adhésion à l'adressine vasculaire des

muqueuses MAdCAM-1 et qui favorise la localisation et la rétention des cellules dans les plaques de Peyer et la lamina propria intestinale (257), sites majeurs de réplication du VIH chez les individus infectés (258). Les Th17 expriment les corécepteurs du VIH CCR5 et CXCR4 et sont hautement permissives à l'infection par les souches virales à tropisme R5 et X4. La fréquence des Th17 dans le sang périphérique est diminuée chez les sujets infectés par le VIH (227). Ces cellules sont aussi diminuées en fréquence dans les intestins et leur déplétion est associée à la translocation microbienne, phénomène impliqué dans l'état d'activation chronique lié à la progression de la maladie (259).

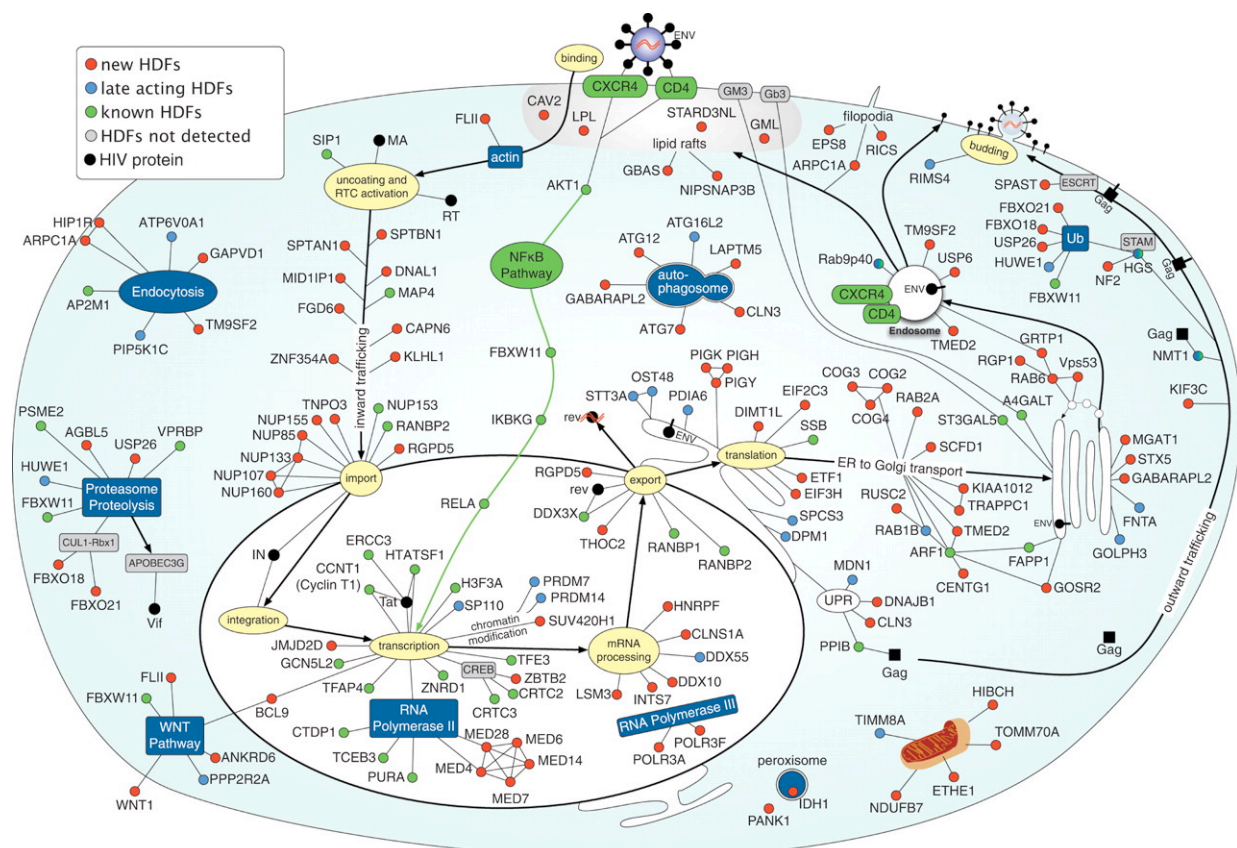
### **1.9.5 Th1Th17**

En 2007, Acosta-Rodriguez et al. ont identifié les récepteurs de chimiokines CXCR3 et CCR6 comme marqueurs d'une sous-population lymphocytaire n'exprimant pas le CCR4, et produisant de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-17. Ces cellules expriment de plus les facteurs de transcription T-bet, associé aux Th1, et ROR $\gamma$ t, associé aux Th17 et ont donc été appelées Th1Th17. Les Th1Th17 prolifèrent et produisent des cytokines entre autres en réponse au *Mycobacterium tuberculosis* (200). Tout comme les cellules Th17, elles expriment l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , les corécepteurs du VIH CCR5 et CXCR4 et sont permissives aux souches virales à tropisme R5 et X4. Leur fréquence est aussi diminuée chez les sujets infectés par le VIH (227).

### **1.10 Facteurs influençant la permissivité au VIH**

Le VIH encode seulement 15 protéines et doit donc exploiter de multiples fonctions de la cellule hôte pour compléter son cycle infectieux. En 2008, Brass et collègues ont réalisé une étude à grande échelle de criblage par ARN interférents sur une lignée cellulaire HeLa modifiée pour exprimer le récepteur CD4, et ce afin de connaître les facteurs cellulaires requis à l'infection par le VIH. Ils ont ainsi identifié plus de 250 facteurs de dépendance du VIH (HDF, *HIV-dependency factors*) dont le récepteur CD4, les co-récepteurs CXCR4 et CCR5, la transportine TNPO3 et des protéines des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et CREB (Figure 6) (260). La même année, deux autres études du génome entier portant sur les facteurs influençant l'infection par le VIH ont été menées (261). L'équipe de König a utilisé des cellules 293T (cellules embryonnaires de rein) transformées et un virus pseudotype réplication incompetent arborant l'enveloppe du VSV-G (262). Ainsi, ce criblage visait à identifier seulement des facteurs cellulaires influençant les étapes précoces du cycle viral à l'exception de l'entrée du

virion. Les cellules ont été transfectées avec des ARN interférants dirigés contre un total de 20,000 gènes, ce qui a permis d'identifier 2 400 gènes candidats parmi lesquels des gènes codant pour des protéines du cytosquelette, des protéines liant les acides nucléiques et même des composantes de la réponse aux dommages de l'ADN. Le troisième criblage a été réalisé par Zhou et al. avec les mêmes cellules que l'équipe de Brass en utilisant une banque d'ARN interférants et un virus compétent pour la réplication (263). En observant la réplication 48h et 96h après l'infection, ils ont identifié un peu plus de 900 gènes régulant la réplication du virus, incluant des composantes liées à la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, aux fonctions mitochondriales et au métabolisme énergétique. Ils ont notamment identifié SERPINB6 (*serpin peptidase inhibitor, clade B, member 6*), une protéine qui protège les cellules contre les lésions ou la mort cellulaire induite par les protéases en inhibant leur activation (264). Cette molécule apparaît également dans les résultats significatifs de nos études par biopuce ADNc (sections 4.2, 4.3 et 5.2). De telles études représentent un grand intérêt afin de développer des stratégies de lutte contre l'infection en interférant avec des molécules cibles de l'hôte.



**Figure 6. Modèle du rôle des facteurs de dépendance (HDF, *HIV dependency factor*) du VIH dans le cycle de réplication viral.** Chaque HDF a été placé à la ou les positions où il est le plus susceptible d'interférer avec le cycle de réplication du VIH. Sont indiqués les HDF identifiés par Brass et al. (en rouge et en bleu), les HDF identifiés par des études précédentes (en vert), les molécules non détectées dans le criblage, mais présentant des interactions d'intérêt (en gris) et les protéines du VIH (en noir). Tiré de Brass et al. (260) et reproduit avec la permission de *American Association for Advancement of Science*, copyright 2008.

### 1.10.1 Voie de signalisation NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B (*Nuclear Factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*) est un facteur de transcription ubiquitaire, mais dont le rôle central est observé dans les cellules du système immunitaire et qui joue un rôle crucial dans l'activation des lymphocytes T (265, 266). Le terme NF- $\kappa$ B désigne en fait un complexe protéique généralement formé par l'hétérodimère p50 et RelA (p65). Découvert en 1986 par l'équipe de David Baltimore (267), cette molécule régule la transcription de plus d'une centaine de gènes cibles (268). En réponse à une variété de stimuli, tels que des cytokines, des agents bactériens ou viraux et des signaux de stress, le complexe cytoplasmique formé par NF- $\kappa$ B(p50/p65)/I $\kappa$ B est activé par phosphorylation, ce qui entraîne I $\kappa$ B vers l'ubiquitination et la dégradation, tandis que NF- $\kappa$ B est relâché et transloqué vers le noyau où il peut interagir avec des séquences spécifiques sur l'ADN pour promouvoir la transcription via le domaine TAD (*Transactivation Domain*) de p65 (269-271).

La voie de signalisation NF- $\kappa$ B représente une cible attrayante pour les agents pathogènes étant donné que son activation est rapide, ne requiert pas de synthèse *de novo* et induit une forte stimulation de la transcription des gènes interagissant avec son domaine de liaison à l'ADN. De plus, les gènes cibles de NF- $\kappa$ B, (e.g. cytokines, facteurs de croissance, proto-oncogènes) ont des effets majeurs sur le cycle cellulaire et le contrôle de l'apoptose que certains virus peuvent exploiter pour mieux se répliquer et/ou pour échapper aux mécanismes de défense de l'hôte (272). Or, le VIH-1 possède un ou des sites de liaison de haute affinité pour NF- $\kappa$ B dans sa séquence LTR, à proximité du site d'initiation de la transcription (273). L'activation de la voie NF- $\kappa$ B permet donc d'aider à la transcription des gènes viraux. L'organisation du LTR dans les différents sous-types du VIH-1 influence grandement l'expression des gènes viraux et la

réplication du virus. Par exemple, le sous-type C (prédominant en Afrique) contient trois sites de liaison NF- $\kappa$ B et a une plus forte activité de transactivation que les autres sous-types qui en ont généralement deux ou un dans le cas du sous-type E (272).

D'un autre côté, dans les cellules immunitaires non activées, les homodimères NF- $\kappa$ B p50/p50 sont prédominants dans le noyau. Ceux-ci ne comportent pas de séquences TAD, mais peuvent interagir avec les promoteurs de certains gènes comportant des séquences de liaisons à NF- $\kappa$ B et y recruter des histones déacétylases (HDACs), ce qui résulte en un changement de conformation de la chromatine et une baisse de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles (274). Cette activité participe au développement de la latence du VIH (section 1.5.2) dans certaines cellules. L'activation de la voie NF- $\kappa$ B permet par contre aux hétérodimères p65/p50 de déplacer les dimères p50/p50 et les HDACs associées du LTR et de favoriser une activité histone acétylase (HAT) pour relancer la transcription virale (87). Cette balance entre la réplication efficace et l'établissement de la latence du VIH contrôlée par la voie NF- $\kappa$ B fait de cette molécule une cible d'intérêt pour des stratégies de traitement de l'infection.

### 1.10.2 TREX1

Les processus de réplication, réparation et recombinaison de l'ADN dans les cellules humaines requièrent souvent l'excision de nucléotides en position 3' terminale. Pour ce faire, les cellules sont dotées de plusieurs exonucléases dites 3'-5'. En 1999, Mazur et Perrino ont identifié une nouvelle exonucléase 3'-5' qu'ils ont nommée TREX1 (*Three prime repair exonuclease 1*) (275, 276). La même année, TREX1 a également été isolée par Hoss et al. sous l'appellation DNase III (277). En 2006, le groupe de Judy Lieberman a identifié TREX1 comme faisant partie du complexe SET (*Suppressor of variegation, Enhancer of zeste, and Trithorax*). TREX1 et SET interagissent dans le cytoplasme et sont transloqués ensemble vers le noyau pour détruire l'ADN en réponse à la génération de superoxyde lors de la mort cellulaire médiée par le granzyme A (278). En utilisant la spectrométrie de masse et des études par biopuces, Stetson et al. ont identifié TREX1 comme étant impliqué dans la reconnaissance de l'ADN stimulant l'interféron (ISD, *interferon stimulatory DNA*). TREX1 régule négativement la production d'IFN IRF3-dépendante en réponse à de l'ADN cytosolique. En effet, de simples brins d'ADN provenant de rétroéléments endogènes s'accumulent dans les



cellules *Trex1*<sup>-/-</sup>, alors que la présence de TREX1 permet leur dégradation. Stetson a ainsi conclu que TREX1 représente un mécanisme pour empêcher l'auto-immunité provoquée par des rétroéléments endogènes (279). En 2008, l'équipe de Judy Lieberman a montré que le VIH-1 induit l'IFN de type 1 dans des cellules TREX1 KO, mais qu'il ne parvient pas à l'induire en présence de l'exonucléase. Des études d'immunoprécipitation ont aussi montré que TREX1 interagit avec l'ADN du VIH, mais pas avec son ARN (280). Pour déterminer l'importance de TREX1 dans le contexte de l'infection par le VIH-1, le laboratoire de Lieberman a conduit des études d'ARN interférence de TREX1 *in vivo* dans des souris humanisées. En inhibant l'expression de TREX1 dans les cellules CD4<sup>+</sup>, Lieberman et al. ont observé une diminution de la transmission du virus et ont montré que TREX1 inhibe l'induction de l'IFN durant l'infection par le VIH en dégradant des fragments d'ADN rétrotranscrits qui autrement s'accumuleraient dans le cytoplasme (281). Ainsi, TREX1 aide le VIH à éviter la détection par une voie de reconnaissance d'ADN de l'immunité innée (282).

### **1.10.3 Facteurs de restriction**

Les cellules humaines ont développé des mécanismes de résistance intracellulaires afin de restreindre les infections virales, entre autres face aux rétrovirus, dont le VIH. Ces facteurs de restriction (e.g. APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ , Téthérine, SAMHD1) visent l'inhibition de certaines étapes spécifiques dans le cycle de réplication viral et sont généralement considérés comme faisant partie de l'immunité innée. Toutefois, la pression de sélection subie par le VIH, ainsi que son grand potentiel de mutation permet souvent au virus de développer des mécanismes de résistance face aux défenses de l'hôte.

#### **1.10.3.1 APOBEC3G**

Lorsque le virus du VIH est déficient en la protéine virale Vif ( $\Delta vif$ ), des virions non infectieux sont produits par les cellules T primaires humaines, ainsi que par différentes lignées cellulaires incluant les CEM, une lignée de cellules lymphoblastiques dérivées d'un cas de leucémie (283). En 2002, afin de d'identifier des gènes qui pourraient procurer une activité antivirale aux cellules hôtes en absence de Vif, le groupe de M. H. Malim a recouru à une stratégie de soustraction d'ADNc basée sur la PCR dans laquelle des cellules permissives (CEM-SS) sont comparées à des cellules non-permissives (CEM) à l'infection par un virus  $\Delta vif$  (284). Cette technique leur permis d'identifier un ADNc de 1.5 kb, gène auquel ils attribuèrent

le nom de *CEM15* (285). Or, la séquence de l'ARNm de CEM15 est identique à celle d'APOBEC3G (*Apoplipoprotein B mRNA-editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like 3G*) qui fut décrite la même année par Jarmuz et al. (286). L'année suivante, en utilisant un système basé sur le virus de la leucémie murine (MLV), le laboratoire de M. H. Malim a montré qu'APOBEC3G est une cytidine déaminase, c'est-à-dire qu'elle désamine les cytidines pour en faire de l'uridine, ce qui résulte en des hypermutations de guanosines à adénosines dans l'ADN (287). Cette enzyme peut ainsi altérer l'ADN viral et compromettre sa réplication, et ce sans altérer l'ADN de l'hôte étant donné la rétention d'APOBEC3G au cytoplasme (288). APOBEC3G peut être incorporée dans le virion et nuire à la transcription inverse dans la prochaine cellule infectée (287). Cependant, la protéine virale Vif peut recruter une E3 ubiquitine ligase pour induire la polyubiquitination et la dégradation protéosomale d'APOBEC3G, empêchant son incorporation dans les virions (23, 285).

#### **1.10.3.2 TRIM5 $\alpha$ et TRIM22**

De 1999 à 2003, plusieurs études ont montré que le VIH peut efficacement infecter les cellules de nombreuses espèces de mammifères, mais pas celles d'un groupe de primates appelé les Cercopithécidés ou singes de l'Ancien monde (*Old World monkeys*) (289-291). En 2004, pour déterminer si un facteur de restriction du VIH espèce-spécifique explique cette résistance à l'infection, l'équipe de Joseph Sodroski a utilisé un vecteur viral pour transduire des cellules HeLa susceptibles au VIH-1-GFP pseudotypé VSVG avec une banque d'ADNc préparé à partir de fibroblastes pulmonaires de singes rhésus macaques (292). De ces cellules transduites, deux clones HeLa se sont montrés résistants à l'infection par le VIH-GFP, mais susceptibles au SIV-GFP. Un insert d'ADNc commun à ces deux clones fut identifié comme correspondant au TRIM5 $\alpha$  (*Tripartite Motif-containing protein 5, isoform alpha*) du rhésus macaque (TRIM5 $\alpha_{rh}$ ). Ce gène code pour une protéine membre de la famille tripartite motif, définie par la présence de trois domaines distincts dont un domaine RING impliqué dans l'ubiquitination (293). TRIM5 $\alpha$  est exprimé de manière constitutive dans plusieurs tissus et peut être induit par l'interféron (294). Une analyse par PCR de l'ADNc viral à différents temps d'infection dans les clones HeLa résistants a révélé une perturbation de la synthèse d'ADNc viral, indiquant un blocage du cycle viral avant ou lors de l'étape de rétrotranscription. En produisant des virions VIH-GFP présentant la capside virale du SIV, Sodroski et al. ont observé une perte de l'activité antivirale du TRIM5 $\alpha_{rh}$ , proposant l'existence d'une barrière espèce-spécifique à la restriction par

TRIM5 $\alpha$ ; la capsid du VIH-1 est reconnue par le TRIM5 $\alpha$  simien, mais elle ne l'est pas par la version humaine (TRIM5 $\alpha_{hu}$ ). En effet, en 2006, Sodroski et collègues ont montré que TRIM5 $\alpha_{rh}$ , mais pas TRIM5 $\alpha_{hu}$ , reconnaît des motifs dans les protéines de la capsid du VIH-1 et restreint l'infection en interférant avec la décapsidation du virus via la dégradation rapide de la capsid (295).

Moins documenté et pourtant décrit avant TRIM5 $\alpha$ , TRIM22 (ou Staf50, *Stimulated trans-acting factor of 50kDa*) a été identifié pour la première fois en 1995 par Tissot et Mechti. L'expression de TRIM22 est induite par l'IFN de type 1 et de type 2 et permet de limiter la transcription du VIH médiée par la région du promoteur viral LTR (296). En 2011, l'équipe de Vicenzi a observé cette inhibition avec des construits LTR ne possédant pas de sites de liaison à NF- $\kappa$ B, suggérant que TRIM22 inhibe la transcription du VIH de façon NF- $\kappa$ B indépendante (297). D'un autre côté, Barr et collègues ont noté une accumulation de la polyprotéine Gag au cytoplasme de cellules infectées dépendante de la présence de TRIM22. Par des expériences utilisant des ARN précurseurs en épingles à cheveux (shRNA, *short hairpin ribonucleic acid*) dirigés ou non contre TRIM22, ils sont parvenus à observer l'inhibition de la relâche des virions à des niveaux d'expression physiologiques de TRIM22 lorsque les cellules sont en présence d'IFN- $\beta$ , illustrant une des voies par lesquelles l'IFN de type 1 permet de limiter la réplication du VIH (298).

### 1.10.3.3 Téthérine

L'expression de divers facteurs de restriction, dont APOBEC3G et TRIM5 $\alpha$ , peut être régulée par l'interféron (299, 300). Pourtant, dès 1989, l'effet le plus observé de l'IFN $\alpha$  sur la réplication du VIH-1 est l'inhibition de la relâche des virions à partir de la cellule infectée (301, 302). Or, il a aussi été montré que la protéine virale Vpu facilite la relâche des particules virales et que l'absence de Vpu peut résulter en une accumulation des virions à la membrane des hôtes (303, 304). En 2006, Bieniasz et al. observent que les particules qui s'accumulent à la surface des cellules infectées par le VIH-1  $\Delta vpu$  sont des virions matures et qu'ils peuvent être retirées par un traitement de protéases, ce qui laisse suggérer qu'une protéine de l'hôte s'attache aux virions et à la membrane plasmique cellulaire pour empêcher la relâche virale (305). L'année suivante, à l'aide de la microscopie électronique, le même groupe parvient à visualiser des liens moléculaires entre les virions et la surface de cellules infectées (306). Bieniasz et collègues

nomment ce nouveau facteur de restriction tétherine (de *tether* en anglais, pour « attacher »). En 2008, les groupes de Bieniasz et de Guatelli identifient indépendamment la tétherine comme étant une protéine membranaire encodée par le gène BST2 (*Bone marrow stromal cell antigen 2*) (307, 308). La protéine virale Vpu peut neutraliser ce facteur de restriction en diminuant l'expression de la tétherine à la surface cellulaire. En effet, Vpu séquestre la tétherine au niveau des endosomes et mène à sa dégradation par les lysosomes (309, 310).

#### **1.10.3.4 SAMHD1**

Les DCs et à un moindre degré les macrophages sont grandement réfractaires à une infection naturelle par le VIH-1 grâce à un mécanisme de restriction interférant avec la rétrotranscription pour la synthèse de l'ADNc viral (311, 312). Or, il a été montré que l'ajout de la protéine virale Vpx du VIH-2 lors d'une infection par le VIH-1 est critique pour l'infection productive des macrophages primaires (313). En 2011, dans le but d'identifier un nouveau facteur de restriction pouvant être surmonté par Vpx, les équipes de Benkirane et Skowronski ont parallèlement conduit des études d'immunoprécipitation afin d'identifier des molécules interagissant directement avec Vpx ou avec CRL4, une protéine déjà identifiée comme s'associant avec Vpx (314, 315). Parmi les candidats les plus abondants, les deux laboratoires ont identifié SAMHD1 (*SAM domain and HD domain-containing protein 1*), une protéine spécifiquement exprimée dans des cellules non permissives au VIH-1 tels que les cellules dendritiques et les macrophages (314). L'étude de Skowronski et collègues a montré que Vpx conduit SAMHD1 à interagir avec une E3 ubiquitine ligase pour induire sa dégradation par le protéasome, abolissant du même coup la résistance de la cellule à l'infection (315). La même année, Webb et al. ont décrit SAMHD1 comme ayant une activité déoxynucléotide triphosphohydrolase, c'est-à-dire pouvant convertir les déoxynucléotides triphosphates (dNTP) en déoxynucléotides et en triphosphates. Le groupe de Webb a alors proposé un mécanisme de restriction selon lequel SAMHD1 restreint la réplication du VIH-1 par l'hydrolyse d'une grande proportion des dNTP cellulaires, inhibant la transcription inverse du génome viral (316). En 2012, en mesurant les pools de dNTP intracellulaires dans les cellules myéloïdes humaines, le laboratoire de Margottin-Goguet a confirmé que SAMHD1 permet de diminuer la concentration en dNTP à un niveau insuffisant pour supporter la transcription inverse, proposant que l'appauvrissement en nucléotide représente un mécanisme général pour la protection des cellules contre divers agents infectieux se répliquant pas un intermédiaire ADN (317).

## 2. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Ce projet de maîtrise se base sur les observations précédentes de notre laboratoire démontrant le fait que les différentes sous-populations de cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires sont hétérogènes du point de vue permissivité à l'infection par le VIH-1. Ainsi, au laboratoire il a été démontré que les cellules à profil de polarisation Th1Th17 (phénotype CXCR3+CCR6<sup>+</sup>) sont permissives alors que les cellules Th1 (phénotype CXCR3+CCR6<sup>-</sup>) sont résistantes à l'infection par le VIH (227, 318). Étant donné que la réplication du VIH dans les cellules cibles dépend de plusieurs facteurs cellulaires agissant à différentes étapes du cycle viral (section 1.10), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les cellules Th1Th17 et Th1 expriment un ensemble de facteurs respectivement de permissivité et de résistance à l'infection par le VIH. Pour l'identification de ces facteurs, nous avons utilisé une approche systématique (technologie de biopuces ADNc; Affymetrix) pour comparer le transcriptome des cellules Th1Th17 et Th1 au niveau du génome entier.

Ainsi notre objectif principal a été d'identifier des signatures transcriptionnelles au niveau du génome entier associées avec distinctes fonctions immunologiques et permissivité au VIH dans les cellules Th1Th17 et Th1. Des études préliminaires de biopuces au laboratoire ayant mis en évidence des gènes exprimés de façon différentielle dans les cellules Th1Th17 (e.g., PPAR $\gamma$ , CXCR6, ARNTL) *versus* Th1 (e.g., SERPINB6, PTK2), ce projet se divise en 4 sous-objectifs :

- 1) identifier des voies canoniques et des fonctions biologiques différemment régulées dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 par l'analyse du transcriptome du génome entier de ces cellules
- 2) valider l'expression différentielle des gènes d'intérêt identifiés par biopuces au niveau des transcrits et des protéines;
- 3) caractériser le rôle fonctionnel de certains de ces facteurs (i.e., PPAR $\gamma$ , ARNTL) sur la réplication du VIH dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1;
- 4) et localiser le niveau auquel ces facteurs interfèrent avec le cycle de réplication du VIH.

### **3. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **3.1 Isolation des cellules mononuclées du sang périphérique**

##### **3.1.1 Obtention de leucaphérèses**

Les sujets non-infectés par le VIH ont été recrutés avec la collaboration des Drs Jean-Pierre Routy et Mohamed-Rachid Boulassel (McGill University). L'approbation par le comité d'éthique interne et le consentement éclairé de chaque participant ont été obtenus. Les cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC, *Peripheral Blood Mononucleated Cells*) ( $10^9$ - $10^{10}$  cellules) ont été récoltées par leucaphérèse suivant un protocole décrit précédemment (319).

##### **3.1.2 Isolation des PBMC par gradient de Ficoll**

Les leucaphérèses ont été centrifugées sur gradient de Ficoll afin de séparer les PBMC (lymphocytes T et B, monocytes, cellules dendritiques, cellules natural killer (NK) et basophiles) des neutrophiles, granulocytes, éosinophiles et des érythrocytes. Les PBMC ainsi recueillies ont été lavées et comptées, puis séparées en aliquotes de 1ml à une concentration de  $50 \times 10^6$  cellules/ml dans du FBS (*Fetal Bovine Serum*, Sigma-Aldrich, Inc., St-Louis, Missouri, États-Unis) 10% DMSO (diméthylsulfoxyde, Sigma-Aldrich) et finalement conservées dans l'azote liquide.

#### **3.2 Tri des cellules T CD4+ mémoires par sélection négative à l'aide de billes magnétiques**

Les PBMCs ont été décongelées, filtrés et comptées, puis resuspendues dans du tampon MACS (*Magnetic-Associated Cell Sorting*) (PBS 1x 10% FBS 2mM EDTA (Bioshop, Burlington, Ontario, Canada)) à une concentration de  $10^7$  cellules/ $10 \mu\text{l}$ . Le tri a été effectué avec la trousse d'isolation par sélection négative des cellules T CD4+ mémoires de Miltenyi (Miltenyi Biotec, Inc., Bergisch Gladbach, Allemagne). Brièvement, les PBMCs ont été marquées par un cocktail d'anticorps (Acs) couplés à la biotine ciblant tous les leucocytes (Acs ciblant les molécules CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD45RA, CD46, CD123, TCR $\gamma/\delta$  et la glycophorine A), excepté les T CD4+ mémoires, pendant 10 minutes à 4°C. Après lavage, les cellules ont été resuspendues à une concentration de  $10^7$  cellules/ $20 \mu\text{l}$  dans du tampon MACS et incubées 10 minutes à 4 °C avec  $20 \mu\text{l}$  d'Acs anti-biotine couplés à des billes magnétiques par  $10^7$  cellules. Après lavage, les cellules ont été placées sur une colonne magnétique MidiMACS

(Miltenyi Biotec) et les cellules non marquées ont pu être récupérées par sélection négative. La pureté des cellules ainsi isolées (typiquement >95%) est déterminée par marquage extracellulaire avec des Acs CD3, CD4 et CD45RA et analyse par cytométrie en flux.

### **3.3 Tri des cellules T CD4+ mémoires CCR6+ et CCR6- par double sélection à l'aide de billes magnétiques**

Les cellules T CD4+ mémoires ont été obtenues par sélection négative tel que décrit à la section 3.2. Ces cellules ont ensuite été lavées avec du tampon FACS (PBS 1X (Gibco), 10% FBS (volume/volume) (Sigma), 0.02% (poids/volume) azide de sodium (Sigma)), puis resuspendues avec des Acs anti-CCR6 PE à une concentration de  $10^7$  cellules/8 $\mu$ l et incubées 20 minutes à 4°C avant d'être lavées et resuspendues dans du tampon MACS à une concentration de  $10^7$  cellules/80 $\mu$ l. Des billes magnétiques anti-PE (Miltenyi) ont été ajoutées à une concentration de 20 $\mu$ l/ $10^7$  cellules et le tout a été incubé 15 minutes à 4°C avant d'être lavé et resuspendu dans du tampon MACS à une concentration de  $10^8$  cellules/500 $\mu$ l. Ce protocole a été mis au point en se basant sur les recommandations d'utilisation fournies par Miltenyi et les concentrations optimales des Acs anti-CCR6 PE ainsi que des billes magnétiques ont été déterminées en comparant la pureté et le rendement obtenus par cytométrie en flux avec différentes concentrations. Cette technique donne de moindres puretés et rendements comparé au tri cellulaire par FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*), mais elle est moins dispendieuse et plus rapide et elle a donc été mise au point afin d'obtenir des cellules pour réaliser des tests d'optimisation sur divers protocoles.

### **3.4 Cytométrie en flux**

La cytométrie en flux consiste à faire passer une à une des cellules marquées par des Acs couplés à des fluorochromes à travers un faisceau laser d'une longueur d'onde précise. La lumière diffusée par la cellule donne des indications sur sa taille (FSC, *Forward Scatter*) et sa granulosité (SSC, *Side Scatter*), alors que la lumière réémise par fluorescence traverse différents filtres permettant de connaître la longueur d'onde d'émission, indiquant ainsi la présence et l'identité des fluorochromes détectés.

**Tableau 1. Caractéristiques des cytomètres en flux LSR II et BD Aria (Becton Dickinson)**

Lasers	Détecteurs	Filtres	Paramètres/Fluorochromes
Bleu 488 nm	FSC		<i>Forward Scatter</i>
	SSC	488/10	<i>Side Scatter</i>
	F	530/30	FITC, CFSE, GFP, Alexa-488
	E	575/26	PE, PI
	D	610/20	PE-TxR
	C	675/14	PE-Cy5, PerCP
	B	710/20	PerCp-Cy5.5, PR-Cy5.5
	A	780/40	PE-Cy7
Rouge 633 nm	C	660/20	APC, Cy5, Alexa-647
	B	720/30	APC-Cy5.5, Alexa-680, Alexa-700
	A	780/60	APC-Cy7
Violet 407 nm	B	440/40	Alexa-405, Pacific Blue, Cascade Blue
	A	525/50	Alexa-430, CFP, AmCyan

Chaque cytomètre est connecté à un ordinateur doté du logiciel DIVA 6.0 (BD FACSDiva 6.0 Software, BD Biosciences) permettant l'utilisation des appareils et l'analyse des résultats.

### 3.4.1 Analyse phénotypique par cytométrie en flux multicolore

Pour procéder à l'analyse par cytométrie en flux, les cellules doivent d'abord être lavées dans un tampon FACS. Les cellules sont par la suite marquées avec des anticorps spécifiques pour la détection de protéines membranaires, tels les récepteurs de chimiokines, pendant 20 minutes à 4°C à l'obscurité. Après marquage, l'excès d'anticorps est retiré par lavage des cellules dans le tampon FACS, puis les cellules sont fixées à l'aide d'un tampon FACS contenant 2% de paraformaldéhyde (Sigma). Chaque anticorps utilisé est couplé avec un fluorochrome spécifique (Tableau 2), ce qui permet l'analyse de l'expression des différentes molécules marquées à l'aide du cytomètre en flux LSR II à 11 couleurs (BD Biosciences, Inc, Franklin Lakes, NJ, États-Unis). L'ajout de *vivid* ou *aqua-vivid* (*Molecular Probes® LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kits*, Invitrogen) permet quant à lui de distinguer les cellules viables des cellules mortes. *Vivid* est un colorant réactif fluorescent qui interagit de manière covalente avec les protéines cellulaires (amines). Le *vivid* ne peut pénétrer la membrane des cellules viables et réagit donc seulement avec les protéines de surfaces de ces cellules, tandis que chez les cellules mortes, la membrane endommagée est traversée par le réactif qui interagit alors avec les protéines de surface ainsi qu'avec les protéines internes. Il en



résulte une fluorescence environ 50 fois plus élevée des cellules mortes comparativement aux cellules vivantes (320).

Le seuil de positivité de chaque couleur détectée au cytomètre est déterminé à l'aide de cellules ou de billes de compensation (BD™ CompBeads, Anti-Mouse Ig and Negative Control, BD Biosciences) marquées avec un seul anticorps servant de contrôles positifs pour chaque fluorochrome et d'un tube de cellules non marquées servant de contrôle négatif. La cytométrie en flux multicolore requiert aussi l'usage de contrôles FMO (*Fluorescence minus one*) dans lesquels sont ajoutés tous les anticorps à l'exception d'un seul, ce qui permet de préciser les fenêtres de positivité en considérant les chevauchements des ondes d'émission du cocktail de fluorochromes dans son ensemble. Avant utilisation, les anticorps ont été titrés et le titre optimal a été choisi pour chaque lot.

**Tableau 2. Anticorps et fluorochromes utilisés pour la cytométrie en flux**

Anticorps	Fluorochrome	Origine	Titre optimal/10 <sup>6</sup> cellules
M anti-H CD3	Pacific blue	BD Biosciences	0.5 µl
M anti-H CD4	Alexa700	BD Biosciences	0.5 µl
M anti-H CD45RA	APC-CY7	BD Biosciences	0.1 µl
M anti-H CCR6	PE	BD Biosciences	1.0 µl
M anti-H CCR4	PE-CY7	BD Biosciences	2.0 µl
M anti-H CXCR3	PE-CY5	BD Biosciences	4.0 µl
M anti-H CCR5	PE	BD Biosciences	7.5 µl
M anti-H CD8	FITC	Miltenyi Biotec	2.0 µl
M anti-H CD19	FITC	Miltenyi Biotec	5.0 µl
M anti-H CD56	FITC	eBiosciences	5.0 µl
	Aqua-vivid	Invitrogen	0.5 µl

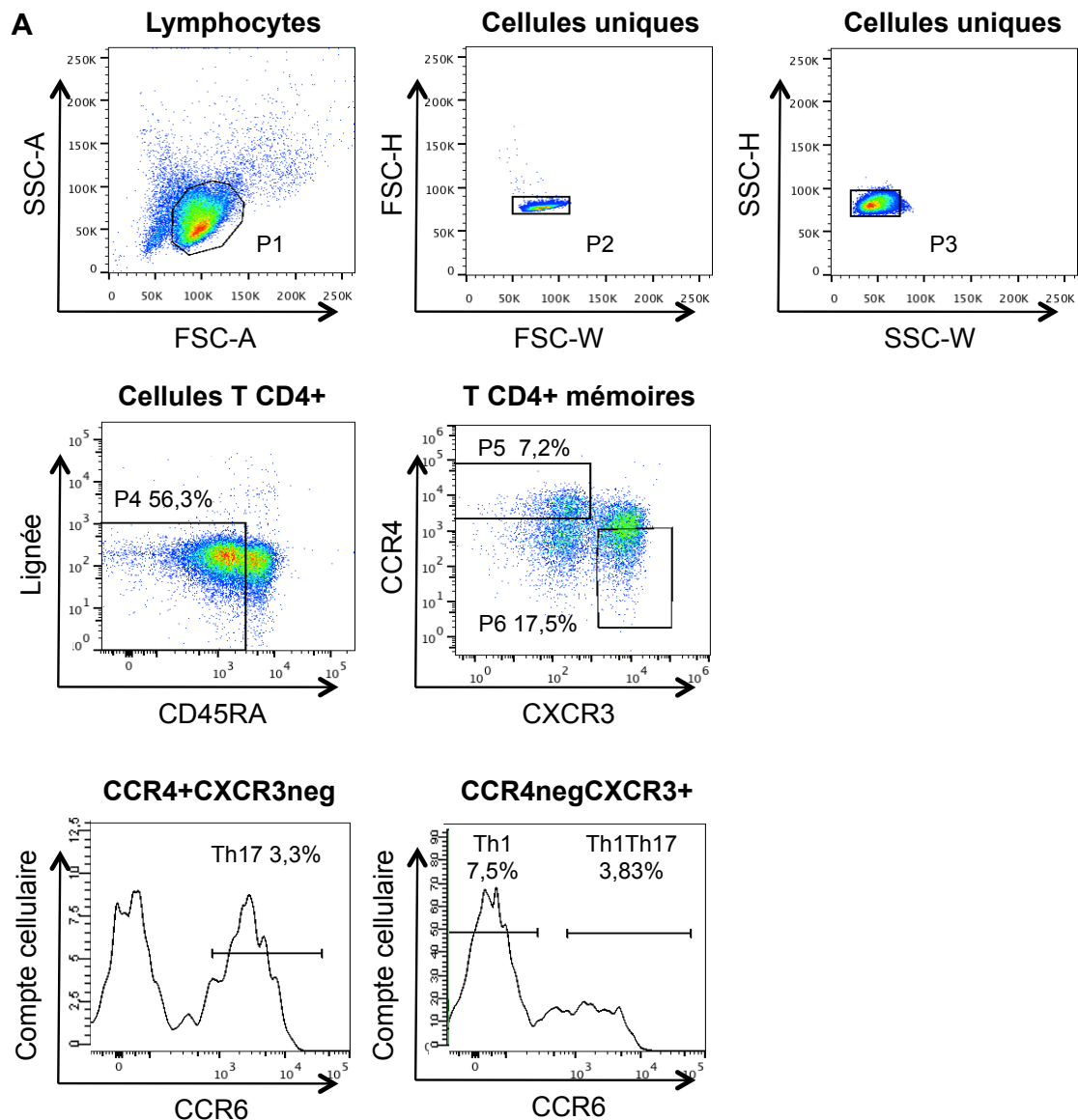
*M, mouse; H, human*

### 3.4.2 Tri des cellules Th1, Th1Th17 et Th17 par FACS

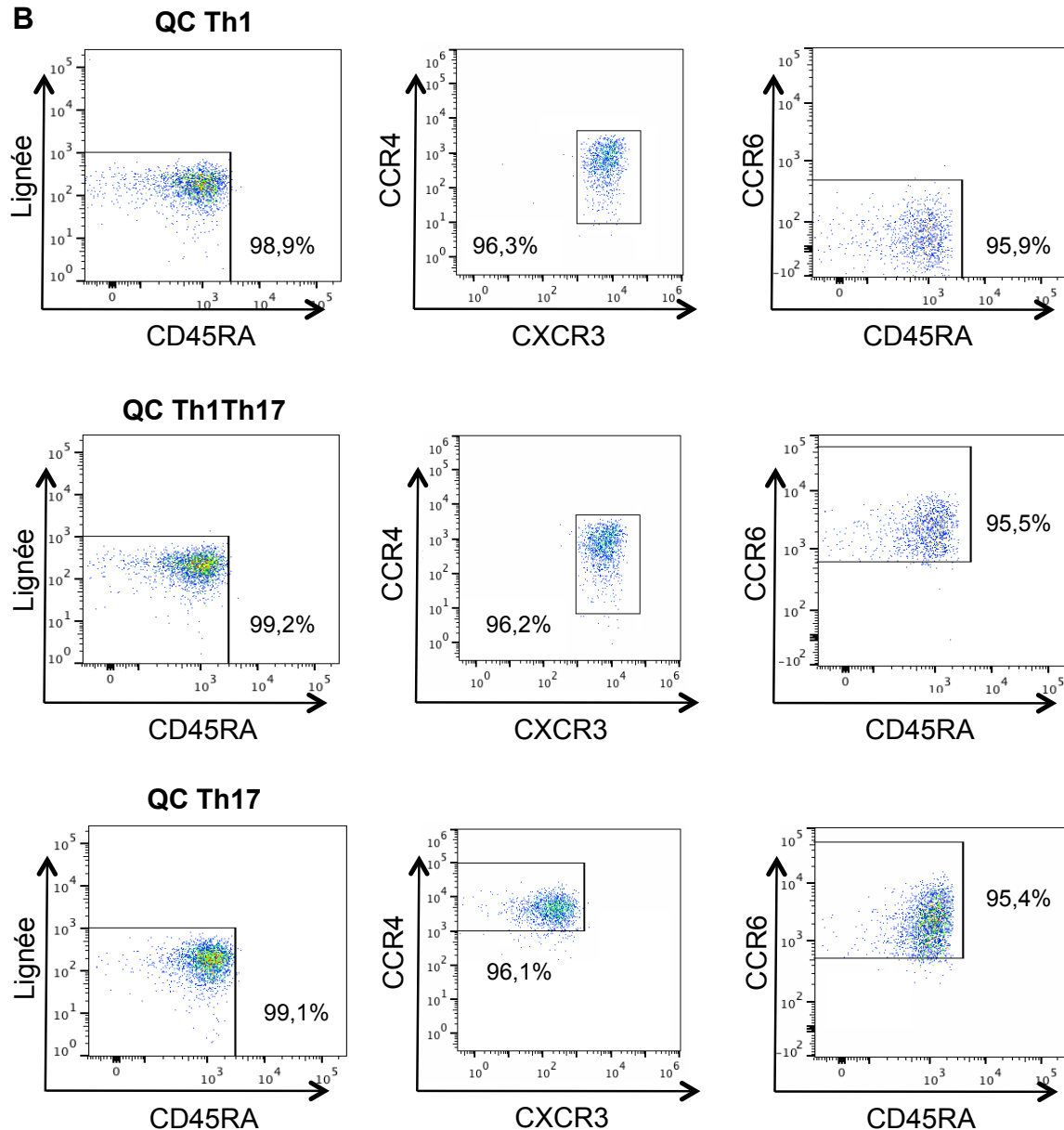
Pour obtenir les sous-populations lymphocytaires, une première isolation des cellules T CD4<sup>+</sup> totale par MACS à partir des PBMC est réalisée selon le protocole décrit (section 3.2) à l'aide de la trousse d'isolation par sélection négative des cellules T CD4<sup>+</sup> de Miltenyi ciblant les molécules CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR  $\gamma/\delta$  et la glycophorine A. Une fois les cellules T CD4<sup>+</sup> totales recueillies, on procède au marquage avec les anticorps couplés aux fluorochromes (tel que décrit section 3.4.1, à l'exception du tampon FACS remplacé par le tampon de tri FACS (PBS 1X, 5% FBS, 25mM Hepes)) : CD45RA, CCR6,

CCR4, CXCR3 (pour identifier les sous-populations Th; section 1.9), CD8, CD19 et CD56 (pour éliminer les possibles contamination par les cellules T CD8+, les lymphocytes B et les cellules NK, respectivement).  $3 \times 10^6$  cellules sont conservées pour réaliser les FMO alors que le reste des cellules est resuspendu dans un ou plusieurs tubes de polypropylène à une concentration de  $40 \times 10^6$  cellules/ml dans du tampon de tri FACS.

Le trieur BD Aria II (Beckton Dickinson) (Tableau 1) est utilisé pour réaliser un tri à haut débit permettant de purifier jusqu'à 4 sous-populations différentes à la fois. Les cellules T CD4+ mémoires (CD45RA-) à phénotype CCR4-CXCR3+CCR6- (profil de polarisation Th1), CCR4-CXCR3+CCR6+ (profil de polarisation Th1Th17) et CCR4+CXCR3-CCR6+ (profil de polarisation Th17) (Figure 7A) sont séparément recueillies dans des tubes 5ml de polypropylène contenant 0.5 ml de FBS. À la fin du tri, 50ul de chacune des sous-populations est placé dans de nouveaux tubes FACS et analysé par cytométrie en flux pour évaluer la pureté (typiquement 95%) des sous-populations cellulaires après le tri (QC, *Quality control*) (Figure 7B). Le tri cellulaire est effectué par Dre Dominique Gauchat, responsable du service de cytométrie du Centre de recherche du CHUM, campus St-Luc.



**Figure 7. Stratégie d'isolation des cellules à profil Th1Th17 et Th1 par cytométrie en flux.** Les cellules T CD4<sup>+</sup> isolées à partir des PBMCs par sélection négative en utilisant des billes magnétiques (pureté >95%) ont été marquées avec des anticorps anti-CD45RA, CD8, CD19, CD56, CCR4, CXCR3 et CCR6 et triées par cytométrie en flux. **A.** Les cellules sont d'abord sélectionnées en évitant les débris (P1) selon la taille (FSC, *Forward scatter*) et la granulosité (SSC, *Side scatter*), puis les cellules uniques, ne formant pas d'agrégats, sont choisies (P2, P3). Les cellules mémoires sont ensuite identifiées par leur phénotype CD45RA<sup>-</sup> tout en évitant les possibles contaminations par des cellules T CD8<sup>+</sup>, les NK ou les lymphocytes B respectivement à l'aide de l'expression de CD8, CD56 et CD19 dans un même canal de couleur (Lignée) (P4). Les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires séparées par leur expression exclusive de CCR4 ou CXCR3 (P5, P6) puis finalement l'expression de CCR6 sur ces 2 sous-populations est observée afin de séparer les cellules à phénotype CCR4-CXCR3+CCR6<sup>-</sup> (profil de polarisation Th1), CCR4-CXCR3+CCR6<sup>+</sup> (profil de polarisation Th1Th17) et CCR4+CXCR3-CCR6<sup>+</sup> (profil de polarisation Th17). Les valeurs indiquées correspondent au pourcentage d'événements inclus dans la fenêtre de sélection par rapport au total de cellules uniques (P3).



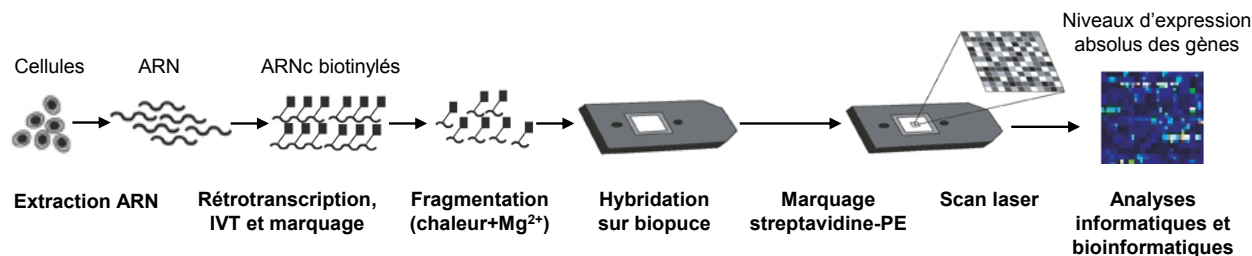
**Figure 7 (suite). Stratégie d'isolation des cellules Th1Th17 et Th1 par cytométrie en flux. B.** Un échantillon de chacune des sous-populations Th1, Th1Th17 et Th17 recueillies par tri cellulaire est analysé en cytométrie en flux à la fin du tri cellulaire afin d'obtenir des contrôles de qualité (QC, *Quality Control*). La pureté des cellules obtenues par cette technique est typiquement >99% pour les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires (CD45RA<sup>-</sup>) et >95% pour les sous-populations. Les valeurs indiquées correspondent au pourcentage d'événements inclus dans la fenêtre de sélection par rapport au total de cellules uniques (P3).

### 3.5 Culture et stimulation des lymphocytes T CD4+

Afin d'activer les lymphocytes T CD4+ purifiés, ces cellules ont été stimulées avec des Ac anti-CD3 (BD Biosciences) immobilisés (0,5ml/puits à une concentration de 1µg/ml durant 1 à 2 heures à température ambiante ou sur la nuit à 4°C) sur une plaque Costar de 48 puits et stimulées avec des Acs anti-CD28 (BD Biosciences) solubles (1µg/ml). Les cellules sont incubées avec ces Acs dans un milieu RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco, Grand Island, NY, États-Unis) 10% FBS 1% P/S (pénicilline et streptomycine, Gibco) pendant 3 jours à 37°C dans un incubateur de culture cellulaire à 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.6 Analyse du transcriptome par biopuce Affymetrix

Dans le but de procéder à une analyse du transcriptome des sous-populations lymphocytaires Th1 et Th1Th17, des PBMC de 4 donneurs non infectés par le VIH ont été triées (tel que décrit section 3.4.2), puis l'ARN des cellules Th1 et Th1Th17 isolées a été extrait et quantifié par spectrophotométrie (tel que décrit section 3.7) par Patricia Monteiro, post-doctorante au laboratoire de 2008 à 2011. Les échantillons d'ARN ainsi obtenus ont été confiés à Génome Québec (Montréal, Qc, Canada) pour traitement, hybridation et lecture de la biopuce. Brièvement, les ARN dont l'intégrité a été validée par la technologie Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Mississauga, Ontario, Canada) ont d'abord été rétrotranscrits en ADNc par une transcriptase inverse avant de procéder à une transcription *in vitro* pour produire des ARNc biotinylés. Ces ARNc ont ensuite été fragmentés puis hybridés sur une biopuce Affymetrix® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix®, Santa Clara, CA, États-Unis). Cette biopuce est recouverte de séquences distinctes d'oligonucléotides disposées précisément couvrant plus de 47 000 transcrits et variants qui eux-mêmes représentent approximativement 39 000 gènes humains. Toutes les séquences incluses sur la matrice ont été sélectionnées par le fabricant à partir de GenBank, dbEST et RefSeq. Après hybridation des ARNc cibles biotinylés, la biopuce est marquée à la streptavidine-phycoérythrine, lavée et finalement analysée à l'aide d'un module GeneArray à une longueur d'onde de 488nm (Figure 8). L'émission de lumière à une longueur d'onde de 570nm est proportionnelle à la quantité d'ARN cible hybridé à chaque position de la biopuce, correspondant ainsi à des transcrits particuliers selon le design de la puce (321, 322).



**Figure 8. Analyse du transcriptome par biopuce Affymetrix.** Adapté de Staal et al. (321) et reproduit avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : Leukemia, copyright 2003.

### 3.6.1 Analyses statistiques

Un premier prétraitement des données Affymetrix a été accompli par François Lefebvre (Département de biochimie, Université de Montréal, Qc, Canada) et les analyses statistiques (valeurs  $p$ , valeurs  $p$  ajustées, facteurs de changement) ont été réalisées par le biostatisticien Jean-Philippe Goulet (CARTaGENE, Université de Montréal), grâce à la collaboration avec les laboratoires de Dr Rafick-Pierre Sekaly et de Dr Elias Haddad (Vaccine and Gene Therapy Institute, Port Ste-Lucie, FL, États-Unis). Les résultats bruts d'expression génique ont été exportés et analysés en utilisant Bioconductor (323), un logiciel open source servant de bibliothèque de données pour les analyses de génomique basé sur le langage R (324). Ce langage de programmation pour le calcul statistique a été utilisé pour prétraiter et normaliser les intensités des sondes à l'aide de la méthode RMA (*Robust Multiarray Averaging*) (325). Les gènes ont ensuite été filtrés par appel de détection et par des filtres de variance pour permettre une réduction du nombre de tests et une augmentation correspondante de la puissance de l'analyse de l'expression différentielle de gènes (326). Sur l'ensemble des 54 675 sondes initiales, 38 113 sondes ont été conservées après ces étapes de filtration. La matrice résultante a été transformée en  $\log_2$  et utilisée pour la modélisation linéaire en utilisant le progiciel Bioconductor *limma* (*Linear Models for Microarray Data*) qui estime le facteur de changement (FC, *fold-change*) entre des groupes prédéfinis. Les valeurs  $p$  ( $p$ -value) des comparaisons ont été ajustées pour des tests multiples selon la méthode de Benjamini et Hochberg (327). Cette méthode contrôle aussi le taux de fausse découverte (FDR, *false discovery rate*). La détermination de l'expression des gènes régulés est basée sur les valeurs  $p$  nominales.

### 3.6.2 Analyses fonctionnelles

#### 3.6.2.1 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) et Gene Ontology (GO)

Pour déterminer si une voie biologique connue ou des ensembles de gènes individuels sont significativement enrichis dans nos données expérimentales, une analyse d'enrichissement d'ensemble de gènes (GSEA, *Gene Set Enrichment Analysis*) a été effectuée comme décrit (328) sur les collections de base de données MsigDB (*Molecular Signature Database*, Broad Institute, MIT, Harvard, Cambridge, MA, États-Unis; [www.broad.mit.edu/gsea/msigdb](http://www.broad.mit.edu/gsea/msigdb)) C2, C3 et C5 par le biostatisticien Jean-Philippe Goulet. La collection C2 comprend 3 272 ensembles de gènes provenant de diverses sources telles que les publications dans PubMed et les bases de données en ligne de voies de signalisation. La collection C3 contient des 836 ensembles avec des gènes qui partagent un motif cis-régulateur conservé à travers les génomes humain, murins et canins. Ces motifs sont catalogués (329) et représentent des éléments de régulation connus ou probables dans les promoteurs et les 3'-UTRs (*untranslated regions*). Ces ensembles de gènes permettent de lier les différences observées par des expériences de biopuces à un élément putatif cis-régulateur conservé. Les 1 454 ensembles de gènes formant la collection C5 sont issus du vocabulaire contrôlé du *Gene Ontology Project* (GO) et sont donc groupés sur la base de 3 types d'annotations : la fonction moléculaire, l'association à une composante ou à un compartiment cellulaire et le processus biologique. Chaque ontologie représente ainsi un aspect unique du produit du gène. Les valeurs p résultant de la GSEA ont été ajustées pour les tests multiples en utilisant la méthode de Benjamini et Hochberg pour contrôler les FDR (327). Les cartes de chaleur basées sur les processus biologiques contenus dans la base de donnée *Gene Ontology* ont été réalisées en ne tenant compte que des gènes différemment exprimés ( $p\text{-value} < 0.05$ ) avec un facteur de changement  $> 1.3$  ou  $< -1.3$  afin de restreindre les candidats. Les analyses par *Gene Ontology* ont été réalisées par Annie Bernier et les cartes de chaleurs correspondantes ont été générées grâce à la collaboration de Jean-Philippe Goulet pour l'utilisation du langage R.

#### 3.6.2.2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Les réseaux de gènes ont été générés par *Ingenuity Pathways Analysis* (Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA, États-Unis; [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)). Un ensemble de données contenant les identifiants des gènes et les valeurs statistiques correspondantes ont été chargées dans

l'application. Chaque identifiant de gène a été lié à son objet gène correspondant dans la base de données Ingenuity (*Ingenuity Pathways Knowledge Base*). L'analyse fonctionnelle a identifié les fonctions biologiques et/ou les voies canoniques les plus significatives face à l'ensemble des données. Les gènes avec une valeur  $p < 0.05$  et associés à des fonctions biologiques et/ou des voies dans la base de données Ingenuity ont été considérés pour l'analyse fonctionnelle. Les gènes issus de cette analyse ont été superposés sur un réseau moléculaire global développé à partir des informations contenues dans Ingenuity. Des réseaux moléculaires plus spécifiques pour les gènes qualifiés d'intérêt ont aussi été générés algorithmiquement en fonction de leur connectivité. L'accès au logiciel IPA est fourni grâce à la collaboration avec le laboratoire de Dr Rafick-Pierre Sekaly (Vaccine and Gene Therapy Institute, Port Ste-Lucie, FL, États-Unis) et les analyses ont été réalisées par Annie Bernier.

### 3.7 RT-PCR quantitative en temps réel par SYBR Green

L'ARN total des cellules a été isolé à l'aide de la trousse *RNeasy Mini Kit* de Qiagen (Qiagen, Inc., Hilden, Allemagne). Brièvement, les cellules ont été lysées avec le tampon RLT inclus dans la trousse et l'ARN a été isolé sur les colonnes RNeasy à la suite de centrifugations et de lavages avec les tampons fournis. La quantité d'ARN recueillie a été mesurée sur un nanophotomètre Pearl (Implen, Inc., Munich, Allemagne) et la qualité de l'ARN a aussi été vérifiée en s'assurant d'avoir des ratios  $260/280\text{nm} \geq 1.800$ , ce qui représente le ratio ADN et ARN *versus* protéines et est un bon indicateur de la pureté. La RT-PCR quantitative en temps réel a été effectuée dans un appareil LightCycler 480 II (Roche, Ltd., Basel, Suisse) en ajoutant 5ng d'ARN et des amorces dans 20 $\mu$ l du mélange de SYBR Green et de transcriptase inverse tous deux inclus dans la trousse QuantiTect SYBR Green RT PCR Kit (Qiagen). Les amorces suivantes ont été utilisées : PPAR $\gamma$  (QT00029841), ARNTL (QT00011844), CXCR6 (QT01156918), CTSB (QT00026614), PTPN13 (QT00054446), MAP3K4 (QT00061152), SERPINB6 (QT01005949), PTK2 (QT00057687) et ISG20 (QT00225372) diluées tel que décrit par le fournisseur (*QuantiTect Primer Assay*, Qiagen); AhR, sens 5'-CTT CCA AGC GGC ATA GAG AC-3' et anti-sens 5'-AGT TAT CCT GGC CTC CGT TT-3' (IDT, Coralville, Iowa, États-Unis); ARN ribosomal 28S, 0.25 $\mu$ M sens 5'-CGA GAT TCC CAC TGT CCC TA-3' et 0.25 $\mu$ M anti-sens 5'-GGG GCC TCC CAC TTA TTC TA-3' (IDT). L'électrophorèse en gel d'agarose 1.5% a été réalisée pour vérifier la taille des produits d'amplification et afin de purifier l'ADN complémentaire (ADNc) spécifique aux amorces grâce à la trousse *QIAquick*



*Gel Extraction Kit* (Qiagen). La concentration d'ADNc ainsi récoltée a été mesurée au nanophotomètre et a servi à la préparation des courbes standards (20000, 2000, 200, 20, 2, 0.2 fg) de chaque gène, ce qui a permis la quantification absolue de l'expression des gènes ciblés par les amorces. L'expression relative de chacun des gènes a été normalisée par rapport aux niveaux d'ARN ribosomal 28S et les profils des courbes de fusion ont été observés afin de s'assurer de la spécificité des produits d'amplification. Toutes les courbes standards ont été réalisées avec des réactions en *triplicata* et les autres échantillons ont été réalisés en *duplicata* ou *triplicata*, selon les quantités d'échantillons disponibles.

### 3.8 Agoniste et antagoniste de PPAR $\gamma$

Afin d'observer les effets de l'activation ou de l'inhibition du récepteur nucléaire peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ), des cellules ont été cultivées en présence d'un agoniste et/ou d'un antagoniste spécifiques de cette molécule. La rosiglitazone (RGZ) (aussi appelée BRL49653) (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, États-Unis) est un ligand synthétique dérivé de la classe des thiazolidinédiones (TZDs) activant PPAR $\gamma$  (330). Elle a été diluée à 50mM dans du DMSO et conservée à -20°C sous forme d'aliquotes, puis utilisée comme agoniste de PPAR $\gamma$  à une concentration de 50 $\mu$ M en culture. La concentration de RGZ utilisée a été choisie en fonction de ses effets biologiques en absence d'effet délétère sur la viabilité des cellules T CD4<sup>+</sup> en culture tel qu'attesté par marquage vivid. Inversement, le T0070907 (Tocris Bioscience, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, États-Unis) est un inhibiteur de PPAR $\gamma$  qui modifie de façon covalente un résidu cystéine de la pochette de liaison des ligands (LBP, *ligand-binding pocket*), empêchant ainsi l'activation du récepteur (331). Le T0070907 a été dilué à 100mM dans du DMSO et conservé sous forme d'aliquotes à -20°C. Il a été utilisé à une concentration de 10 $\mu$ M en culture pour agir comme inhibiteur de PPAR $\gamma$ . Les effets respectivement agoniste et antagoniste de PPAR $\gamma$  ont été observés en microscopie confocale à fluorescence de par la localisation cytoplasmique ou nucléaire de PPAR $\gamma$ .

### 3.9 Agonistes d'Ahr

Pour observer les effets de l'activation de la voie du récepteur aryl hydrocarbène (AhR), des cellules ont été cultivées en présence d'un agoniste spécifique d'Ahr. Le TCDD ou 2,3,7,8-

tétrachlorodibenzo-p-dioxine (Cambridge Isotope Laboratories, Cambridge, MA, États-Unis) est un composé aromatique tricyclique chloré ayant une forte affinité pour le récepteur AhR et permettant son activation et sa translocation nucléaire (332). Le TCDD a été dilué à 100µM dans du DMSO et conservé à -20°C sous forme d'aliquotes, puis utilisé comme agoniste d'AhR à une concentration de 5nM en culture. Le FICZ ou 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, États-Unis), un agoniste naturel d'AhR dérivé du tryptophane, a été utilisé en parallèle de la même façon à une concentration de 100nM (333). Les concentrations de TCDD et FICZ utilisées ont été choisies sur la base d'expériences menées par Patricia Monteiro ((334) et résultats non publiés).

### **3.10 Mesure de la prolifération cellulaire : méthode de la dilution de la CFSE**

Pour déterminer la prolifération cellulaire des lymphocytes T, les PBMCs ont été chargées en CFSE (*Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester*) (Sigma-Aldrich, Inc., St-Louis, Missouri, États-Unis). Brièvement, les PBMCs ont été lavées dans du tampon phosphate salin 1X (PBS, *phosphate-buffered saline*, Gibco, Grand Island, NY, États-Unis), puis suspendues à 10x10<sup>6</sup> cellules/ml dans une solution de CFSE à une concentration de 10µM et incubées durant 8 minutes en obscurité à température ambiante. Chaque lot de CFSE a été titré et sa concentration optimale déterminée. Ensuite, 1ml de sérum humain (inactivé à la chaleur, 60 min à 56°C) a été ajouté par 20x10<sup>6</sup> cellules et incubé 2 minutes à température ambiante en obscurité. Les cellules ont été lavées et cultivées sur une plaque 48 puits et stimulées à l'aide d'Acs anti-CD3 immobilisés et CD28 solubles (tel que décrit section 3.5) dans un milieu de prolifération (RPMI, 10% sérum humain, 1% l-glutamine, 1% HEPES, 1% PS) durant de 3 à 6 jours. La prolifération a été observée par cytométrie en flux après de 3 à 6 jours de culture, les cellules ayant proliférées exprimant alors plus faiblement le CFSE (CFSE<sup>low</sup>).

### **3.11 Détection de cytokines par ELISA**

Les surnageants de cultures cellulaires sont recueillis et conservés à -20°C. Les ELISAs sont réalisés à l'aide des kits *ELISA Ready-SET-Go!* (eBioscience, Inc., San Diego, CA, États-Unis) et selon le protocole du fabricant. En résumé, une plaque 96 puits est incubée avec un anticorps spécifique à la cytokine à détecter durant 2h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C. Après lavage, les surnageants des cultures cellulaires à doser sont ajoutés aux puits pour 1h d'incubation. Une courbe standard (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25 et 15.625 pg/ml) de la

cytokine visée est réalisée par dilution  $\frac{1}{2}$  à partir du stock (1 $\mu$ g/ml) fourni avec le kit et aussi ajoutée à des puits. Après lavages, l'anticorps anti-cytokine couplé à la biotine est ajouté pour 1h d'incubation. Suite à de nouveaux lavages, la solution d'avidine-HRP est déposée dans les puits et incubée pour une période de 30 minutes. La plaque est lavée à nouveau et le substrat tétraméthylbenzidine (TMB) est ajouté. Lorsqu'une coloration suffisante est visible, une solution d'arrêt (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1mol/L) est ajoutée avant de lire l'absorbance à 450 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Model 550 Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis). La concentration en cytokines de chaque puits est déterminée à l'aide de la courbe standard.

### **3.12 Production de stocks viraux à partir de plasmides**

#### **3.12.1 Culture des cellules 293T**

Les cellules 293T (cellules épithéliales embryonnaires de rein exprimant constitutivement l'antigène T simien, le SV40 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, États-Unis)) préservées dans l'azote liquide sont décongelées et lavées dans du DMEM (Gibco, Grand Island, NY, États-Unis) 20% FBS 1% P/S avant d'être cultivées dans une flasque dans du DMEM 10% FBS 1% P/S à 37°C. Lorsque les cellules sont à 100% de confluence, on retire le surnageant et on ajoute de la trypsine durant 2 minutes pour aider à décoller les cellules du fond des flasques. On ajoute ensuite du FBS pour neutraliser la trypsine et on sépare les cellules dans 4 nouvelles flasques, ce qui correspond à un passage cellulaire. On peut passer 10 à 15 fois les cellules de cette façon pour les multiplier.

#### **3.12.2 Transfection à l'aide du Fugene et récolte des virions**

Lorsque les cellules 293T atteignent 80% de confluence, on les lave puis on peut procéder à la transfection avec les plasmides viraux. Pour ce faire, on ajoute du Fugene (FuGENE® 6 Transfection Reagent, Roche) à un milieu de culture OptiMEM et on incube 5 minutes à température ambiante. On ajoute ensuite ce milieu à 10 $\mu$ g de plasmide viral pour 15 minutes d'incubation. On ajoute ensuite le tout aux cellules que l'on remet à incuber à 37°C. Le Fugene, un réactif multi-composantes contenant des lipides, se complexe avec l'ADN plasmidique et permet son entrée dans les cellules (335). Après 48 heures, on récolte le surnageant que l'on centrifuge et filtre (45 $\mu$ m) pour bien retirer les débris cellulaires et on le conserve à -80°C sous

forme d'aliquotes de 0.5 ml/microtube vissé. La concentration du stock viral est déterminée par quantification de la protéine p24 du VIH-1 par ELISA.

### **3.13 Souche de VIH-1 utilisée et infection**

Les souches NL4.3BaL type sauvage (WT, *Wild Type*) et NL4.3BaL GFP à tropisme R5 sont produites par transfection des cellules 293T avec l'ADN plasmidique contenant le génome complet des virus (section 3.12.2). La souche NL4.3BaL WT a été obtenue à partir d'un plasmide du laboratoire de R. Pomerantz (Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, États-Unis), alors que la souche NL4.3BaL GFP à moins grande virulence dans laquelle la protéine virale Nef est remplacée par la molécule fluorescente GFP a été obtenue du laboratoire de Dr Dana Gabuzda (Boston, MA, États-Unis). Pour l'infection, les cellules à infecter sont lavées et resuspendues dans environ 0.2 ml de RPMI 10% FBS 1% P/S dans un tube Falcon de 15 ml. Le virus est ajouté selon la quantité souhaitée, généralement 50ng de protéine p24 du VIH/10<sup>6</sup> cellules, d'après la titration du virus par ELISA. Le tout est vortexé brièvement et incubé pour 3 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois dans du RPMI pour retirer les virions excédentaires et remises en culture à 37°C sur une plaque 48 ou 96 puits dans du RPMI 10% FBS 1% P/S avec de l'IL-2 (5ng/ml; R&D Systems).

### **3.14 Détection de la protéine p24 du VIH par ELISA**

Les surnageants des cultures de cellules infectées recueillis tous les 3 jours sont neutralisés avec du tampon de neutralisation (*Disrupting buffer 5X*: PBS, 0.05% Tween-20, 2.5% Triton X-100, 1% bleu de trypan, 0.02% thimérosal) durant 1h à 37°C, puis utilisés pour performer un ELISA p24 afin de quantifier la réplication virale par mesure de la protéine p24 du VIH. Une trousse ELISA comprenant les anticorps nécessaires a été développée par le laboratoire du Dr Sekaly (83, 227) et la streptavidin poly-HRP ainsi que le substrat TMB ont été obtenus de Fitzgerald Industries International (North Acton, MA, États-Unis). La concentration en protéine p24 de chaque puits a été déterminée à l'aide d'une courbe standard (320, 160, 80, 40, 20, 10 et 5 pg/ml) produite à partir d'un stock de surnageant provenant de la culture de cellules ACH2 infectées. Ce surnageant a été neutralisé avec du tampon de neutralisation de la même façon que les échantillons, puis dosé à l'aide d'un kit de dosage commercial de la protéine p24 (Alliance® HIV-1 p24 Antigen ELISA Kit, PerkinElmer, Woodbridge, Ontario, Canada). Il a ensuite été

dilué à une concentration de 10 ng p24/ml dans 50% glycérol et conservé à 4°C pour être utilisé pour les futures courbes standards.

### **3.15 PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral du VIH-1**

La quantification de l'ADN intégré du VIH-1 a été effectuée par PCR nichée en temps réel en utilisant la technique FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) comme décrit précédemment (83, 336) en utilisant les réactifs inclus au Tableau 3. En bref, les cellules infectées par le VIH ont été lysées sur la nuit dans un tampon comprenant la protéinase K (Invitrogen™, Life Technologies Inc., Burlington, Ontario, Canada). 10<sup>5</sup> cellules/15µl de lysat ont été utilisées pour une première étape d'amplification dans un appareil Mastercycler gradient (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, États-Unis) en utilisant le JumpStart Taq Ready Mix (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, États-Unis) et la Taq polymérase (Invitrogen). L'amplification est composée de 12 cycles (1 min à 95°C, 1 min à 55°C, et 10 min à 72°C), précédés d'une étape de dénaturation de 8 minutes à 95°C et suivis d'une étape d'élongation de 15 min à 72°C. Au cours de cette amplification, l'ADN proviral est amplifié à l'aide de deux amorces Alu (Alu1 et Alu 2) et une amorce spécifique pour la séquence LTR du VIH (amorce LM667 associée à un fragment λT). Le gène CD3 est amplifié simultanément dans le même tube en utilisant des amorces spécifiques afin de déterminer précisément le nombre de cellules par réaction (Tableau 3).

Les produits d'amplification du Alu/VIH et du CD3 issus de cette première PCR ont été par la suite ré-amplifiés séparément à l'aide du LightCycler 480 II (Roche, Ltd., Basel, Suisse) pour la PCR nichée en temps réel avec la technique FRET. Cette technique utilise deux sondes complémentaires au produit d'amplification juxtaposées, une associée à un fluorochrome donneur (fluorescéine) en 3' et une autre associée à un fluorochrome accepteur (Light Cycler (LC) Red 640 ou le LC Red 705) en 5'. Les sondes sont choisies de façon à s'hybrider à des séquences cibles très proches l'une de l'autre. Lorsque les deux sondes sont éloignées, le fluorochrome donneur émet une faible fluorescence ou bruit de fond, alors que lorsqu'elles sont hybridées de 6 à 10 nucléotides de distance, la proximité des deux fluorochromes permet le transfert de l'énergie du donneur vers l'accepteur, provoquant la fluorescence de ce dernier (337). La fluorescence émise au moment de l'hybridation des sondes à leurs séquences cibles est proportionnelle à la quantité d'ADN amplifiée. Les profils des courbes de fusion peuvent

être observés afin de s'assurer de la spécificité des produits d'amplification. Ainsi, dans la seconde PCR, l'amplification et la détection de l'ADN proviral utilise une amorce complémentaire à la séquence  $\lambda$ T et autre complémentaire à la région U5 du LTR du VIH (AA55M), ainsi que deux sondes spécifiques pour le LTR du VIH. Pour ce qui est du gène CD3, deux amorces internes et deux sondes spécifiques au CD3 ont aussi été utilisées (Tableau 3). Cette PCR est réalisée en utilisant le réactif LightCycler® 480 Probes Master (Roche) est composée de 45 cycles d'amplification (10 secondes à 95°C, 10 secondes à 60°C, et 15 secondes à 72°C), précédés d'une étape de dénaturation de 4 minutes à 95°C et suivis de la courbe de fusion (8 secondes à 95°C, 1 minute à 45°C, puis une montée lente de température jusqu'à 95°C en mode d'acquisitions continues). La température d'acquisition lors des cycles d'amplification est fixée à 60°C et choisie selon les températures de fusion de toutes les sondes (Tableau 3) pour assurer leur hybridation lors de l'acquisition.

Les réactions PCR ont été réalisées en *duplicata* ou en *triplicata*, selon les quantités disponibles. Les cellules ACH2 (obtenues par le NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) portant une copie d'ADN proviral par cellule ont été utilisées pour générer la courbe standard. Les cellules A3.01 non-infectées et un tube sans cellules servent de contrôles négatifs. Les résultats sont exprimés en nombre de copies d'ADN proviral/ $10^6$  cellules en considérant 2 copies de CD3 par cellule.

**Tableau 3. PCR en temps réel pour la quantification de l'ADN proviral du VIH-1**

<b>Amorces et sondes</b>	<b>Séquences</b>	<b>T<sub>m</sub></b>
Amorce sens HCD3-externe	5'-ACT GAC ATG GAA CAG GGG AAG-3'	60.0°C
Amorce anti-sens HCD3-externe	5'-CCA GCT CTG AAG TAG GGA ACA TAT-3'	60.3°C
Amorce sens HCD3 interne	5'-GGCTATCATCATTCTTCTTCAAGGT-3'	56.3°C
Amorce anti-sens HCD3-interne	5'-CCTCTCTTCAGCCATTTAAGTA-3'	56.3°C
Sonde CD3 #1 Fluorescéine (donneur)	5'GGC TGA AGG TTA GGG ATA CCA ATA TTC CTG TCT C-3'-Fluorescéine	66.9°C
Sonde CD3 #2 LC Red 705 (accepteur)	LC Red 705- 5'-CTA GTG ATG GGC TCT TCC CTT GAG CCC TTC-3'-Phosphate	68.9°C
Amorce LM667-λT	5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC TCT GGC TAA CTA GGG AAC CCA CTG-3'	65.3°C
Amorce Alu 1	5'-TCC CAG CTA CTG GGG AGG CTG AGG-3'	68.8°C
Amorce Alu 2	5'-GCC TCC CAA AGT GCT GGG ATT ACA G-3'	65.3°C
Amorce λT	5'-ATG CCA CGT AAG CGA AAC T-3'	55.4°C
Amorce anti-sens AA55M	5'-GCT AGA GAT TTT CCA CAC TGA CTA A-3'	58.7°C
Sonde LTR #1 Fluorescéine (donneur)	5'-CAC AAC AGA CGG GCA CAC ACT ACT TGA- 3'-Fluorescéine	65.0°C
Sonde LTR #2 LC Red 640 (accepteur)	LC Red 640-5'-CAC TCA AGG CAA GCT TTA TTG AGG C-3'-Phosphate	62.0°C

*T<sub>m</sub>, melting temperature (température de fusion); LC, Light Cycler*

### 3.16 Interférence ARN

La cinétique d'expression de l'ARNm des cibles souhaitées pour l'interférence est d'abord déterminée par RT-PCR quantitative en temps réel par SYBR Green (section 3.7) à différents temps après stimulation des cellules T CD4+ *via* CD3/CD28 afin de déterminer le moment optimal pour procéder à l'interférence ARN. Les cellules sont ensuite transfectées avec l'ARN interférent (ARNi) ou avec un ARN non spécifique comme contrôle dans un appareil Amaxa (Lonza, Ltd., Basel, Suisse) en utilisant la trousse de transfection adaptée aux cellules T de la compagnie (*Amaxa Human T-cells Nucleofector kit*). Une fois entré dans la cellule, l'ARN double brin interagit avec une ribonucléase appelée Dicer qui clive l'ARN double brin en plus petits fragments et les transfère au complexe protéique RISC (RNA-induced silencing complex). Les ARNm complémentaires au brin du complexe RISC sont dégradés et ne sont donc pas traduits en protéines (338, 339). Les ARN interférents suivants ont été utilisés : siPPAR $\gamma$ , *ON-TARGET plus SMART pool siRNA for PPAR $\gamma$*  (#L-003436-00, Dharmacon; Thermo Fisher Scientific, Chicago, IL, États-Unis) siAhR, 5'-AAGUCGGUCUCUAUG CCGCtt-3' (Genesys, Sigma-Aldrich) et siNT (ARNi non spécifique), *ON-TARGETplus Non-targeting Pool* (#D-001810-10, Dharmacon). L'efficacité de l'interférence ARN est déterminée par RT-PCR, ainsi que par Western blot.

### 3.17 Technique de Bradford

La technique de Bradford a été utilisée afin de doser les protéines de divers échantillons en utilisant la trousse *Quick Start Bradford Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Californie, États-Unis). Pour résumer, diverses concentrations (0.015, 0.031, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 et 2 mg/ml) de la protéine BSA (*Bovine Serum Albumin*, BioShop® Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada) ont été obtenues en réalisant des dilutions ½ à partir de la solution de BSA à 2mg/ml fournie par la trousse pour constituer la courbe standard. Ces dilutions ainsi que les lysats protéiques à doser ont été ajoutées en *triplicata* à une plaque de 96 puits Immulon (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, États-Unis) avec le colorant *Quick Start Bradford Dye Reagent 1X* (Bio-Rad). Le tout a été incubé de 5 à 10 minutes à température pièce, le temps de voir la coloration commencer à changer dans la plupart des puits de la courbe standard, avant que la plaque soit placée dans un spectrophotomètre (Synergy HT, BioTek®, Winooski, VT, États-Unis) afin de lire l'absorbance à 595nm. La concentration de chaque échantillon a été déterminée à l'aide la courbe standard.

### 3.18 Immunobuvardage

Les cellules ont été lysées dans 400µl/10<sup>7</sup> cellules de tampon RIPA 1X (Cell Signaling). Brièvement, le tampon de lyse est ajouté aux cellules, ainsi que des inhibiteurs de protéases (*Complete Mini EDTA-free Protease Inhibitors*, Roche) et de phosphatases (*PhoSTOP*, Roche). Le tout est vortexé puis incubé 15 minutes sur la glace avant d'être centrifugé 10 minutes à 14 000g à 4°C. Les lysats protéiques ainsi obtenus ont été dosés par la technique de Bradford (section 3.17) et du bleu de dépôt (*Laemmli Sample Buffer 2X*, Bio-Rad) a été ajouté aux échantillons afin de pouvoir visualiser la progression du front de migration. Le tout a été chauffé 10 minutes à 100°C pour dénaturer les protéines avant d'être chargé sur le gel d'acrylamide. Un des puits a aussi été chargé avec 8µl de l'échelle de poids moléculaires *Precision Plus Protein Dual Color Standards* de Bio-Rad. À la fin de la migration, les gels ont été démoulés et les protéines transférées sur une membrane de PVDF préhydratée dans du méthanol 100%. Une coloration au rouge ponceau permet de visualiser si le transfert s'est bien effectué. Une incubation 45 minutes dans du TPBS (PBS 1X 0.1% Tween) 5% lait permet la saturation des sites aspécifiques.



Pour chaque protéine à révéler, la procédure suivante est ensuite répétée séparément. Premièrement, la membrane est incubée en agitation 2 heures à température ambiante ou sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du TPBS 5% lait ou 5% BSA, selon les recommandations du fournisseur. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 minutes dans du TPBS. L'anticorps secondaire, aussi dilué dans du TPBS 5% lait ou 5% BSA, est incubé avec la membrane durant 45 minutes à température pièce et en agitation. Après 3 nouveaux lavages, un quatrième lavage dans du PBS 1X est effectué avant d'ajouter 2ml de substrat de révélation (*ECL Plus Western BLotting Detection System*, GE Healthcare) et de développer les films en chambre noire.

**Tableau 4. Anticorps utilisés pour les expériences d'immunobuvardage**

Anticorps	Clone	Origine	Dilution	Bande
R anti-H AhR	SA210	Biomol Research Laboratories	1/1000	95 kDa
R anti-H ARNTL	H-170	Santa Cruz Biotechnology	1/250	69 kDa
R anti-H PPARG	C26H12	Cell Signaling	1/1000	53 kDa
M anti-H $\beta$ -actine	AC-15	Sigma-Aldrich	1/5 000	42 kDa
G anti-R IgG + HRP		Cell Signaling	1/1000-10 000	
G anti-M IgG + HRP		Thermo Fisher Scientific	1/25 000	

*R, rabbit; H, human; G, goat; HRP, horseradish peroxidase*

Dans le cas où deux protéines donnent des bandes de tailles similaires ou qu'un fort signal masque une autre bande à détecter à proximité, la membrane est incubée dans 10ml de tampon de décapage (stripping buffer, *Re-Blot Plus Strong Solution 10X*, Millipore, Temecula, Californie, USA) durant 15 minutes en agitation à température ambiante avant d'être lavée dans du PBS. On peut ensuite procéder à nouveau avec l'incubation de l'anticorps primaire, puis secondaire.

### 3.19 Microscopie confocale à fluorescence

Les cellules à visualiser en microscopie sont suspendues dans du RPMI et déposées sur une lame de culture 8 puits (BD BioCoat™, Becton Dickinson, NJ, US) pré-recouverte de polylysine-D afin d'obtenir 80 000 cellules/puits. Après centrifugation, le surnageant est remplacé par un tampon de fixation de paraformaldéhyde 3.7% durant 30 minutes. Les cellules sont ensuite lavées et incubées dans une solution de NH<sub>4</sub>Cl 50 mM durant 20 minutes, ce qui permet de diminuer l'autofluorescence des échantillons. Après lavage en PBS, les cellules peuvent être

marquées à l'aide des anticorps primaires et secondaires. Un puits dans lequel on ajoute les anticorps secondaires seulement sert de contrôle.

Dans le cas où des marquages extracellulaires et intracellulaires sont à réaliser, on débute par le marquage extracellulaire. Les cellules sont incubées 1 heure dans du PSB 1% BSA afin de bloquer les sites non spécifiques et toutes les dilutions d'anticorps se font aussi dans du PBS 1% BSA. L'anticorps primaire est ajouté et incubé 2 heures à température ambiante ou sur la nuit à 4°C et l'anticorps secondaire ajouté après lavage est incubé 30 minutes à température ambiante. Pour le marquage intracellulaire, les cellules doivent d'abord être perméabilisées en étant incubées 5 minutes dans une solution de PBS 0.5% Triton. L'anticorps primaire est incubé 2 heures et l'anticorps secondaire durant 1 heure. Les cellules sont lavées une dernière fois en PBS et les chambres de culture sont éjectées de la lame. Lorsque la lame est bien sèche, une goutte de DAPI (*ProLong Gold Antifade with DAPI*, Invitrogen™, Molecular Probes®, Life Technologies Inc., Burlington, Ontario, Canada) est ajoutée à chaque puits, ce qui permettra de visualiser le noyau des cellules. Une lamelle (22x50mm, VWR, Radnor, PA, US) est finalement déposée sur le dessus de la lame et le tout est laissé à sécher sur la nuit avant d'être scellé à l'aide d'un vernis. Les lames peuvent ensuite être observées à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence (Axio Observer.Z1 Cell Observer®, Carl Zeiss, Oberkochen, Allemagne) et peuvent être conservées à 4°C ou à -20°C à plus long terme. Les images sont obtenues à l'aide du logiciel AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss) et peuvent être analysées pour fin de statistiques à l'aide du logiciel ImageJ (NIH, États-Unis).

**Tableau 5. Anticorps et fluorochromes pour les expériences de microscopie confocale**

<b>Anticorps</b>	<b>Clone</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Origine</b>	<b>Dilution</b>
R anti-H PPARG	C26H12		Cell Signaling	1/200
M anti-H CCR6	11A9		BD Pharmigen	1/100
G anti-M IgG		Cy3	Invitrogen	1/500
G anti-R IgG		Alexa Fluor 488	Invitrogen	1/500
		DAPI	Invitrogen	

*R, rabbit; H, human; M, Mouse; G, goat*

### **3.20 Statistiques**

Les différences statistiquement significatives entre différents groupes (des valeurs de  $p < 0.05$  ont été considérées statistiquement significatives) ont été calculées à l'aide du test paramétrique de Student pour des échantillons appariés et non appariés, les tests non paramétriques de Mann-Whitney (pour des échantillons non appariés) et de Wilcoxon (pour des échantillons appariés), comme indiqué dans les légendes des figures. Toutes les analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, États-Unis).

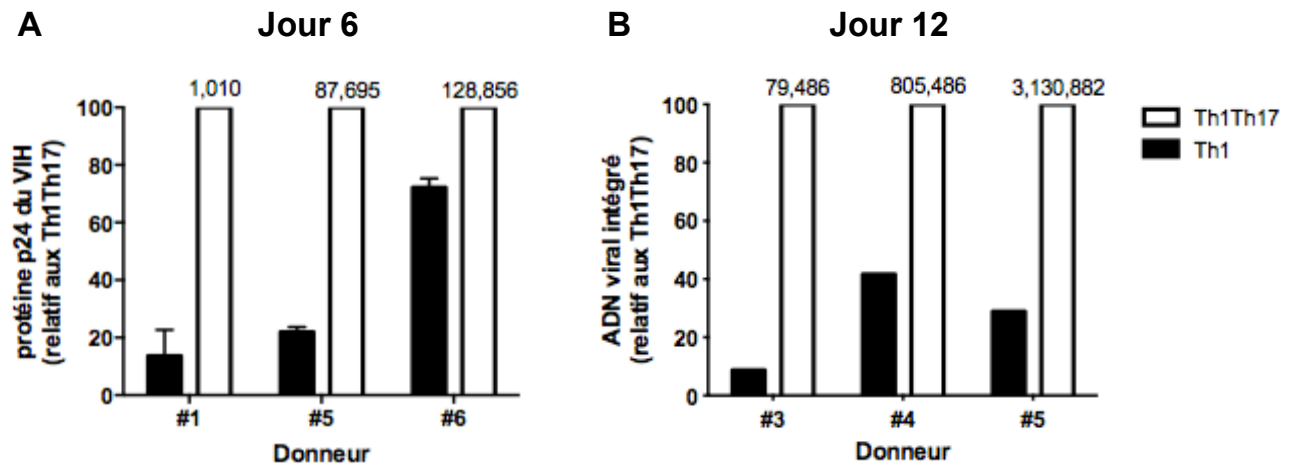
## 4. RÉSULTATS

### 4.1 Permissivité à l'infection par le VIH-1 des cellules T CD4+ à profil de polarisation Th1Th17 *versus* Th1

Des études récentes menées à notre laboratoire ont démontré que les sous-populations de lymphocytes T CD4+ mémoires à phénotype CCR4- CXCR3+ CCR6- et CCR4- CXCR3+ CCR6+, que nous nommerons respectivement Th1 et Th1Th17 subséquentment pour fin de simplification, sont hétérogènes du point de vue permissivité à l'infection par le VIH-1. Plus spécifiquement, les cellules Th1Th17 sont hautement permissives à l'infection, alors que les cellules Th1 y sont plutôt résistantes (227). Ces résultats servant de prémisse à notre projet de recherche, nous les avons validés en incluant de nouveaux donneurs et en utilisant la même souche virale à tropisme R5 et le même stock viral que pour la majorité des expériences présentées aux sections 4.4 et 4.5.

Tel qu'attendu, nous avons détecté des niveaux élevés de réplication du VIH dans les cellules Th1Th17 comparativement aux cellules Th1 après 6 jours d'infection *in vitro* (Fig. 9A), et ce malgré une hétérogénéité marquée de la permissivité à l'infection entre les donneurs, tel qu'indiqué par les valeurs de concentrations (ng/ml) en protéine p24 du VIH. Après 6 jours d'infection, la forte réplication virale chez certains donneurs, notamment le donneur #5, a résulté en une mortalité élevée observée en microscopie optique par la présence de débris cellulaires et une diminution du nombre de cellules plus importante dans les puits contenant des cellules Th1Th17 comparativement à ceux contenant des cellules Th1. Les niveaux d'ADN viral intégré au génome cellulaire étaient aussi significativement plus élevés dans les Th1Th17 par rapport aux Th1 au jour 12 après l'infection (Fig. 9B) (test t apparié,  $p < 0.05$  Th1Th17 *versus* Th1). Ces résultats confirment que les lymphocytes T CD4+ à profil Th1Th17 du sang périphérique sont très permissives à l'infection *in vitro* par une souche à tropisme R5 du VIH, tandis que les cellules à profil Th1 y sont relativement résistantes.

Figure - Section 4.1



**Figure 9. Les cellules à profil de polarisation Th1Th17 et Th1 sont respectivement permissives et résistantes à l'infection par le VIH-1.** Les cellules CXCR3+CCR6+ et CXCR3+CCR6- ont été triées par cytométrie en flux et stimulées *via* CD3/CD28 pendant 3 jours. Les cellules ont été exposées à une souche virale du VIH à tropisme R5 (NL4.3BAL avec GFP à la place de Nef; 50 ng p24 du VIH/10<sup>6</sup> cellules) pour 3h à 37°C, puis lavées et mises en culture à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/ml dans du RPMI 1640 10% FBS et IL-2 (5 ng/ml). **A.** Les surnageants sont recueillis tous les 3 jours et remplacés par des milieux frais. Les niveaux de protéine p24 du VIH dans les surnageants sont quantifiés par ELISA. **B.** Les cellules sont récupérées à jour 12 post-infection et l'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire est mesurée par PCR en temps réel. **(A, B)** Les données sont représentées relativement aux niveaux des cellules Th1Th17. Les valeurs indiquées au-dessus des barres représentent **(A)** la concentration en protéine p24 (ng/ml) et **(B)** le nombre de copies d'ADN viral intégré/10<sup>6</sup> cellules des cellules Th1Th17. **(A, B)** Les résultats sont représentatifs d'expériences réalisées avec les cellules de plus de 5 donneurs différents (n=2, Annie Bernier; autres donneurs par Annie Gosselin).

#### **4.2 Étude de l'expression différentielle des gènes au niveau du génome entier par biopuce ADNc des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> à profil Th1Th17 *versus* Th1**

Afin d'identifier des signatures transcriptionnelles associées avec distinctes fonctions biologiques pouvant permettre d'expliquer la susceptibilité préférentielle des cellules Th1Th17 *versus* Th1 à l'infection par le VIH, Patricia Monteiro a réalisé des études d'analyse transcriptionnelle au niveau du génome entier avec des biopuces ADNc en utilisant la technologie Affymetrix. Les analyses que nous en avons faites révèlent que sur un total de 54 675 sondes, 38 113 ont été détectées et conservées après normalisation et filtration par appel de détection et variance pour nos 8 échantillons provenant de 4 donneurs non infectés par le VIH (Fig. 10A). L'analyse transcriptionnelle a été réalisée sur des cellules après trois jours de stimulation CD3 et CD28, ce qui pour d'autres expériences correspond au moment de l'infection des cellules. L'analyse de variance à un critère pour identifier les sondes différemment exprimées dans les deux sous-populations lymphocytaires a indiqué un total de 780 sondes ( $p < 0.05$ ), soit 438 exprimées à la hausse et 342 à la baisse dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 d'après le facteur de changement entre les deux groupes (Fig. 10 A-C).

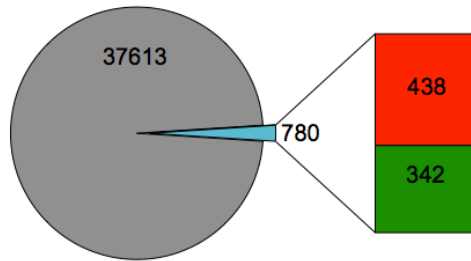
Pour restreindre le nombre de gènes candidats à une recherche approfondie, nous avons ensuite établi un facteur de changement seuil à 1.3, ce qui correspond à 500 sondes dont 265 sont exprimées à la hausse et 235 à la baisse dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 (Fig. 10D, panneau de droite). Ces 500 sondes correspondent à 59 transcrits inconnus et 334 gènes connus dont 172 sont exprimés à la hausse et 162 à la baisse dans les Th1Th17 *versus* Th1. En considérant une *p-value* ajustée, ce nombre passe toutefois à 2 gènes exprimés à la hausse (RORC et IL-22) et aucun à la baisse, étant donné le nombre d'échantillons limité à 4 donneurs et la grande hétérogénéité des niveaux d'expression entre les donneurs (Fig. 10D, panneau de gauche). Les 334 gènes différemment exprimés et avec un  $FC > 1.3$  ou  $FC < -1.3$  incluent des marqueurs connus des cellules à polarisation Th17 (i.e. CCR6, RORC, IL-17, CCL20, IL-22) (200), ce qui représente une validation initiale des résultats obtenus par biopuce (Tableaux 6A et 6B).

Il est à noter que des études au niveau du génome entier par biopuces ADNc ont aussi été menées au laboratoire en utilisant la technologie Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, États-Unis) sur les quatre sous-populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et Th1Th17 chez cinq

donneurs non infectés par le VIH (résultats non montrés). Ces travaux ont été réalisés par Patricia Monteiro, post-doctorante au laboratoire de 2008 à 2011, puis analysés par Aurélie Cleret-Buhot, post-doctorante au laboratoire depuis 2011. Les résultats obtenus par Illumina (Human Ref-6 V3 BeadChip) confirment les différences d'expression de plusieurs transcrits obtenus par Affymetrix (e.g.  $PPAR\gamma$ , CXCR6), mais diffèrent pour certains transcrits (e.g. ISG20 (section 4.3 et Figure supplémentaire 1)). Ceci s'explique en partie par les différences entre les deux technologies. En effet, la technologie Affymetrix utilise des sondes ADN de 25 nucléotides, alors que l'Illumina utilise des sondes de 50 nucléotides, ce qui est plus restrictif. La technologie Affymetrix est généralement plus sensible car elle nécessite l'utilisation de 1  $\mu$ g d'ARN par puce, alors que la technologie Illumina nécessite 100ng d'ARN par puce; ainsi, la technologie Affymetrix permet la détection d'un plus grand nombre de transcrits, tandis que la technologie Illumina peut être appliquée à des petits échantillons d'ARN provenant de sous-populations cellulaires rares.

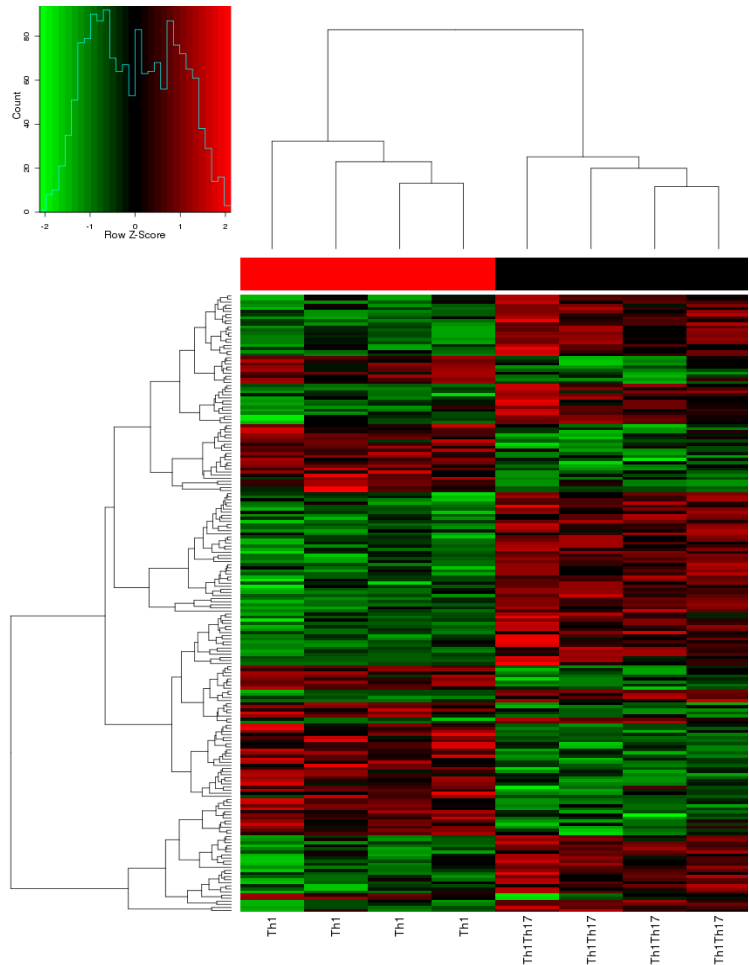
## Figures - Section 4.2

**A. Sondes détectées (n = 38113)**

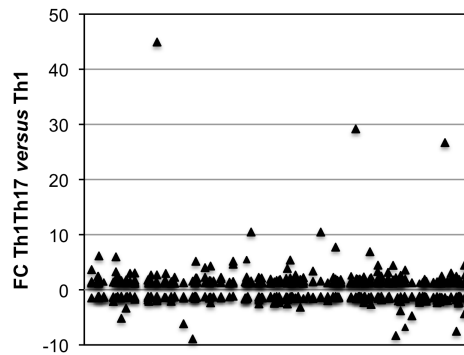


■ Non différemment exprimés  
 ■ Différemment exprimés  
 ■ Régulés à la hausse  
 ■ Régulés à la baisse

**C. P-value < 0.05 (n = 780)**



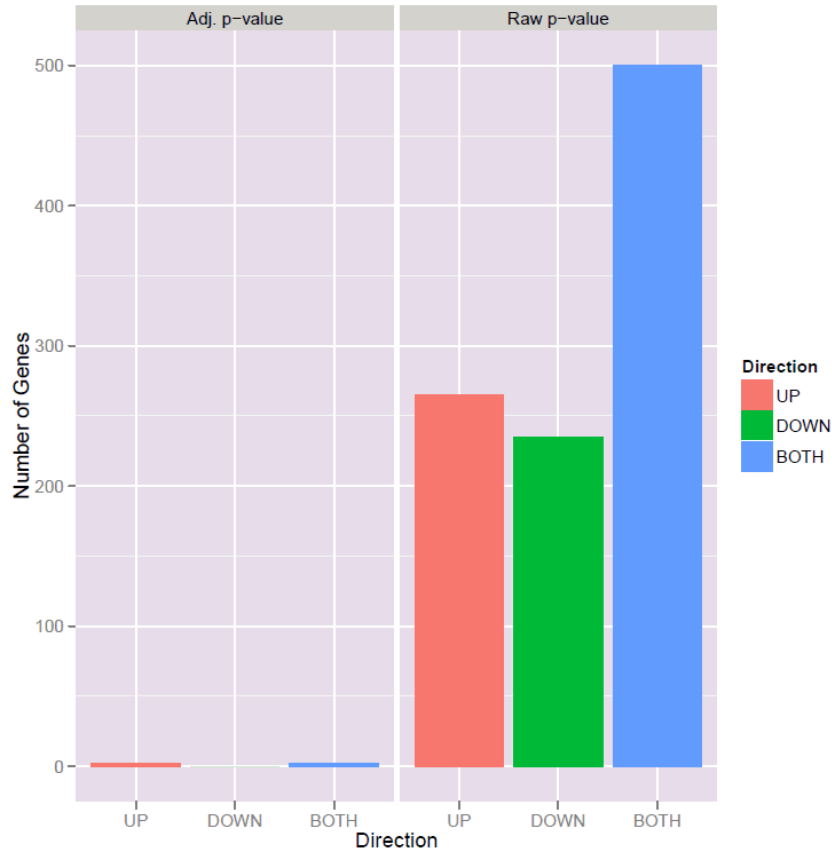
**B. P-value < 0.05 (n = 780)**



**Figure 10. Analyse par biopuce de l'expression différentielle des gènes au niveau du génome entier dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires CXCR3+CCR6<sup>+</sup> (profil Th1Th17) versus CXCR3+CCR6<sup>-</sup> (profil Th1).** Les cellules T CD4<sup>+</sup> de quatre donneurs non infectés par le VIH ont été isolées par sélection négative en utilisant des billes magnétiques (pureté >95%), puis marquées avec des anticorps anti-CD45RA, CCR4, CXCR3 et CCR6. Les cellules ont été triées par cytométrie en flux afin de séparer les cellules mémoires (CD45RA<sup>-</sup>) CXCR3+CCR4-CCR6<sup>+</sup> et CXCR3+CCR4-CCR6<sup>-</sup>. Ces cellules ont été stimulées *via* CD3/CD28 durant 3 jours. L'ARN total a été extrait en utilisant une trousse d'extraction de Qiagen. 100 ng d'ARN a été rétrotranscrit en ADNc et hybridé sur une puce U133 Plus 2.0 du génome humain incluant >47,000 ensembles de sondes (Affymetrix). Une analyse de variance à un critère (ANOVA) a permis d'identifier les gènes différemment exprimés avec une valeur  $p < 0.05$  et de les classer selon leur facteur de changement ( $FC > 1$  ou  $< -1$ ). **A.** Nombre de sondes détectées (n=38113) selon leur expression préférentielle dans les cellules Th1Th17 (n=438) versus Th1 (n=342). **B.** Facteur de changement (FC) des sondes différemment exprimés dans les Th1Th17 versus Th1 (n=780). **C.** Carte de chaleur indiquant les niveaux relatifs d'expression des sondes différemment exprimées (n=780) dans les sous-populations Th1Th17 versus Th1 des quatre donneurs.



**D. P-value < 0.05, FC > |1.3|**



**Figure 10 (suite). Analyse par biopuces de l'expression différentielle de gènes au niveau du génome entier dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires CXCR3+CCR6<sup>+</sup> (profil Th1Th17) versus CXCR3+CCR6<sup>-</sup> (profil Th1). D.** Parmi les gènes avec une valeur  $p < 0.05$ , un facteur de changement (FC) seuil  $> 1.3$  (gènes exprimés à la hausse) ou  $< -1.3$  (gènes exprimés à la baisse) est considéré pour sélectionner les gènes d'intérêt avec une expression différentielle. Le graphique indique le nombre de gènes régulés à la hausse (FC $>1.3$ ), à la baisse (FC $<-1.3$ ) ou simplement le nombre de gènes différemment exprimés dans les cellules Th1Th17 versus Th1 en fonction de la valeur  $p$  (n=500) ou de la valeur  $p$  ajustée (n=2).

**Tableau 6A. Gènes d'intérêt exprimés à la hausse dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1**

<b>Symbole</b>	<b>FC</b>	<b>Valeur <i>p</i></b>	<b>Nom du gène</b>
IL17A	44,94	6,31E-05	interleukin 17A
IL22	29,18	5,42E-05	interleukin 22
CCL20	26,69	6,39E-06	chemokine (C-C motif) ligand 20
IL17F	10,47	3,88E-02	interleukin 17F
RORC	7,73	1,54E-06	RAR-related orphan receptor C
IL26	6,90	5,64E-05	interleukin 26
IL23R	6,14	5,51E-05	interleukin 23 receptor
CTSH	5,46	1,90E-05	cathepsin H
CCR6	5,38	6,70E-04	chemokine (C-C motif) receptor 6
PTPN13	4,45	1,28E-04	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13
IL1R1	3,39	3,96E-03	interleukin 1 receptor, type I
LST1	2,60	7,24E-04	leukocyte specific transcript 1
CXCR6	2,44	2,89E-03	chemokine (C-X-C motif) receptor 6
AQP3	2,32	2,32E-02	aquaporin 3 (Gill blood group)
MCAM	2,27	5,78E-04	melanoma cell adhesion molecule
CCR2	2,25	3,39E-02	chemokine (C-C motif) receptor 2
RORA	2,14	5,01E-03	RAR-related orphan receptor A
CD80	2,08	1,27E-02	CD80 molecule
IL18RAP	2,05	4,87E-02	interleukin 18 receptor accessory protein
PPARG	2,04	1,85E-02	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
TNFRSF25	2,01	8,22E-03	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
TNFSF13B	1,95	1,43E-02	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
LTB	1,87	1,24E-02	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
ARNTL	1,72	2,91E-02	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like
IL15	1,69	1,18E-02	interleukin 15
IL12RB1	1,56	3,05E-02	interleukin 12 receptor, beta 1
THY1	1,54	4,30E-02	Thy-1 cell surface antigen
MAP3K4	1,53	3,49E-03	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4
CEACAM1	1,52	2,11E-02	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
IL2	1,51	4,12E-02	interleukin 2
ATF5	1,46	1,79E-02	activating transcription factor 5
CD40LG	1,45	3,65E-02	CD40 ligand
S100A4	1,41	2,73E-02	S100 calcium binding protein A4
RUNX1	1,40	1,17E-02	runt-related transcription factor 1
CD28	1,37	4,65E-02	CD28 molecule
TRIM8	1,36	1,06E-02	tripartite motif-containing 8
CTSC	1,35	1,43E-02	cathepsin C
CASP4	1,34	2,52E-02	caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
CYP27B1	1,33	3,07E-02	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1
FASLG	1,33	4,58E-02	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)

**Tableau 6B. Gènes d'intérêt exprimés à la baisse dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1**

Symbole	FC	Valeur <i>p</i>	Nom du gène
XCL1	-7,53	1,02E-03	chemokine (C motif) ligand 1
IL5	-3,35	1,02E-02	interleukin 5 (colony-stimulating factor, eosinophil)
LAIR2	-2,57	4,13E-03	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 2
IL4	-2,47	1,28E-02	interleukin 4
TIGIT	-2,36	6,32E-04	T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
IL17RB	-2,33	5,01E-03	interleukin 17 receptor B
CXCL10	-2,31	4,63E-02	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
FCRL3	-2,30	4,81E-02	Fc receptor-like 3
SLAMF7	-2,08	2,68E-02	SLAM family member 7
PTK2	-2,01	3,71E-04	PTK2 protein tyrosine kinase 2
CXCR5	-2,00	1,25E-02	chemokine (C-X-C motif) receptor 5
CADM1	-1,89	3,70E-02	cell adhesion molecule 1
CD109	-1,84	3,37E-02	CD109 molecule
SERPINB6	-1,80	3,49E-03	serpin peptidase inhibitor, clade B, member 6
PECAM1	-1,76	4,39E-03	platelet/endothelial cell adhesion molecule
NFIA	-1,64	8,56E-03	nuclear factor I/A
TIAM2	-1,64	7,65E-03	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2
BCL2L14	-1,63	3,24E-02	BCL2-like 14 (apoptosis facilitator)
ACPL2	-1,58	1,34E-02	acid phosphatase-like 2
IFI27	-1,57	2,56E-02	interferon, alpha-inducible protein 27
CCL17	-1,54	1,92E-02	chemokine (C-C motif) ligand 17
ALCAM	-1,54	9,16E-03	activated leukocyte cell adhesion molecule
H1FO	-1,50	1,97E-02	H1 histone family, member 0
PLA2G4A	-1,49	3,01E-02	phospholipase A2, group IVA
HTATIP2	-1,49	3,38E-02	HIV-1 Tat interactive protein 2
ISYNA1	-1,48	2,56E-02	inositol-3-phosphate synthase 1
TAF15	-1,47	3,99E-02	TAF15 RNA polymerase II, TBP-associated factor
GATA3	-1,46	1,47E-02	GATA binding protein 3
HLA-DOA	-1,42	3,20E-02	major histocompatibility complex, class II, DO alpha
GRK5	-1,39	4,15E-02	G protein-coupled receptor kinase 5
AARS	-1,37	2,05E-02	alanyl-tRNA synthetase
MARS	-1,36	4,08E-02	methionyl-tRNA synthetase

**Tableau 6.** Sur les 334 gènes avec une valeur *p* <0.05 et FC>1.3 ou FC<-1.3, 40 gènes exprimés à la hausse (en rouge, A) et 32 exprimés à la baisse (en vert, B) dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 ont été sélectionnés selon leur intérêt et leur pertinence dans le contexte de l'infection à VIH-1 à partir des données de la littérature.

#### 4.2.1 Analyses par Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) et Gene Ontology (GO)

Afin d'identifier les processus biologiques différemment régulés dans les cellules Th1Th17 et Th1, une analyse par *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) a été menée à partir des niveaux d'expression de l'ensemble des sondes détectées. Les scores d'enrichissement, *p-values* nominales et taux de fausse découverte (FDR) ont été générés pour un grand nombre d'ensembles de gènes disponibles dans la base de données des signatures moléculaires (MSigDB) du Broad Institute. Les fonctions biologiques ou voies de signalisation obtenant une *p-value* < 0.05 ont été triées selon leur score d'enrichissement normalisé (NES). Cette analyse a révélé des différences significatives entre les deux sous-populations lymphocytaires notamment au niveau de leur potentiel migratoire (i.e. migration transendothéliale) et de leur activation (i.e. adhésion cellule-cellule, voie CTLA-4, réponse aux bactéries, cascade MAPKKK), ainsi qu'au niveau des voies de signalisation liées à l'apoptose (Fig. 11).

#### 4.2.2 Classification par fonction biologique *via* Gene Ontology

Pour déterminer plus précisément comment ces différences peuvent influencer les cellules Th1Th17 et Th1 dans le contexte de l'infection à VIH, les 334 gènes différemment exprimés ( $p < 0.05$ ,  $FC > 1.3$  ou  $FC < -1.3$ ) ont été classés selon leurs fonctions biologiques à l'aide des bibliothèques *Gene Ontology* (GO). Les 13 catégories représentées ont été choisies sur la base des résultats obtenus préalablement par l'analyse GSEA. Les cartes de chaleur de ces fonctions biologiques indiquent une nette distinction dans les profils d'expression géniques entre les deux sous-populations de lymphocytes, en plus de présenter la variabilité entre les donneurs (Fig. 12 A-M).

##### 4.2.2.1 Molécules d'adhésion, cytokines et chimiokines

Les gènes plus fortement exprimés dans les cellules Th1Th17 comparativement aux cellules Th1 incluent ceux codant pour les molécules d'adhésion MCAM (*melanoma cell adhesion molecule*, qui facilite l'entrée des cellules T au niveau du système nerveux central lors de la sclérose en plaques (340, 341)) et CEACAM1 (*carcinoembryonic antigen cellular adhesion molecule 1*, une molécule dont l'expression est augmentée par l'activation cellulaire (342)), les récepteurs de chimiokines CCR6 (essentiel pour la migration des cellules T dans les plaques de Peyer (226) et le système nerveux central (SNC) (343)), CCR2 (co-facteur de fusion pour certaines souches du VIH (344) dont l'expression serait associée aux cellules T produisant

de l'IL-17 (345)) et CXCR6 (corécepteur mineur du VIH (205), jouant un rôle essentiel dans la formation de la synapse immunologique avec les cellules exprimant le ligand CXCL16 (209)), les récepteurs de cytokines IL1R1 (dont le ligand IL-1 permet d'augmenter la prolifération et la différenciation des cellules T (346)), IL12RB1 et TNFRSF13B et les cytokines IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26 et lymphotoxine bêta (LTB). Les gènes plus exprimés dans les cellules Th1 incluent ceux codant pour les molécules d'adhésion ALCAM (*activated leukocyte cell adhesion molecule*, impliquée dans la migration vers le SNC (347)), PECAM1 et CAMD1, l'antigène de surface Thy-1, la protéine tyrosine kinase 2 (PTK2/FAK, dont l'activation est impliquée dans la déstabilisation des jonctions serrées (348)), le récepteur CXCR5 (associé aux cellules T auxiliaires folliculaires (Tfh) (349) et aux lymphocytes B, son expression sur les cellules B est diminuée chez les patients séropositifs (350)), les chimiokines CCL17 (ligand du CCR4 (351)), CXCL10 (ligand du CXCR3 (352)), XCL1/lymphotactine (ligand de XCR1, son expression est augmentée par la protéine Tat du VIH (353)) et les cytokines IL-5 et IL-4 (deux interleukines associées au profil Th2 respectivement impliquées dans la commutation de classe des immunoglobulines E (239) et dans le recrutement des éosinophiles (238)) (Fig. 12 A, B). Ces résultats identifient les récepteurs de chimokines CCR2 et CXCR6 et le récepteur à l'IL-1 (IL1R1) comme de nouveaux marqueurs de cellules à polarisation Th1Th17 qui pourraient augmenter leur susceptibilité au VIH et favoriser leur prolifération. Le récepteur CXCR5 apparaît quant à lui comme un nouveau marqueur des cellules à profil Th1. En plus de leur expression de CCR2 et CCR6 qui pourraient faciliter le recrutement des cellules Th1Th17 dans les plaques de Peyer et le cerveau (226, 354), l'expression différentielle des molécules d'adhésion liées à la migration vers le système nerveux central, MCAM par les cellules Th1Th17 et ALCAM par les cellules Th1, indique des mécanismes différents de recrutement de ces cellules vers le cerveau.

#### 4.2.2.2 Réponses inflammatoire et immune

Les cellules Th1Th17 expriment à de plus hauts niveaux les ARNm correspondants à la molécule de costimulation CD28, au CD40 ligand (CD40LG/CD154, impliqué dans l'activation cellulaire (355)) et FAS ligand (FASLG, lié à l'induction de l'apoptose et dont l'expression est augmentée par la protéine Nef du VIH (356)), aux cytokines IL-2 (qui induit la prolifération des cellules T (357)) et IL-15 (qui stimule la réponse des cellules NK (358)), au récepteur de cytokines IL23R (dont le ligand IL-23 est impliqué dans le maintien du profil Th17 (254)), à la

protéine accessoire du récepteur IL-18 (IL18RAP) et au récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*, qui inhibe la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires lorsque activé dans les macrophages (359)). Du côté des cellules Th1, on retrouve à nouveau l'expression préférentielle des ARNm correspondant aux cytokines de CCL17, CXCL10, XCL1, IL-5 et IL-4 (Fig. 12 C, D). Ainsi, les cellules à polarisation Th1Th17 apparaissent comme possiblement plus susceptibles à l'activation (CD28, CD40LG), à la prolifération cellulaire (IL-2) et à l'apoptose (FASLG), tout en exprimant un facteur dont l'activation permettrait d'inhiber leur différenciation et leur production de cytokines pro-inflammatoires (PPAR $\gamma$ ).

#### 4.2.2.3 Différenciation et transcription

Les gènes exprimés à la hausse dans les cellules à profil Th1Th17 incluent la molécule de costimulation CD80, les récepteurs de TGF- $\beta$  (cytokine nécessaire à la différenciation des cellules à profil Th17 induisant l'expression de RORC (360)) TGFBR1 et TGFBR2, les facteurs de transcription RORC, RORA, RUNX1 (*runx-related transcription factor 1*, important pour la régulation du développement hématopoïétique et la différenciation des cellules T (361)), PPAR $\gamma$  (dont l'activation inhibe pourtant l'expression de RORC (362)), ATF5 (*activating transcription factor 5*, dont l'activation conduit à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires (363)) et la protéine hélice-boucle-hélice ARNTL (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*, impliquée dans le maintien du rythme circadien (364)). Les cellules Th1 expriment quant à elles plus fortement les ARNm correspondant au facteur de transcription GATA3 (lié au profil de polarisation Th2 (365)), ainsi qu'aux 10 gènes de la famille ZNF (*zinc finger protein*) qui codent pour de petites protéines comportant un motif avec un atome de zinc et dont certaines régulent la transcription d'une multitude de gènes (366): ZNF80, ZNF82, ZNF107 (rôle suggéré dans la prolifération et la survie des cellules (367)), ZNF167, ZNF295, ZNF382 (inhibe la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (368)), ZNF443 (impliqué dans la réponse apoptotique suite à l'irradiation (369)), ZNF642, ZNF767 et ZNF827 (Fig. 12 E, F). Les sous-populations Th1Th17 et Th1 expriment donc des profils distincts de facteurs de transcription qui influencent différemment leur différenciation et leurs fonctions biologiques.

#### 4.2.2.4 Prolifération et cycle cellulaire

Les cellules Th1Th17 se distinguent aussi du profil Th1 par leur expression de la protéine convertase *FURIN* (transforme dans leur forme active plusieurs régulateurs de la croissance cellulaire (370)), l'homologue de la phosphatase et de la tensine *PTEN* (pouvant être activée par la protéine de la matrice du VIH p17, associée avec les effets neurotoxiques du virus (371) et l'apoptose médiée par la protéine virale *Tat* (372)), *LST1* (*leukocyte specific transcript 1*, un inhibiteur de la prolifération (373)), le cytochrome *CYP27B1*, le récepteur de l'IL-12 (*IL12RB1*, suggéré ayant un rôle dans la différenciation et/ou la prolifération des cellules produisant de l'IL-17 (374)), et la cytokine *CSF2/GM-CSF* (*colony stimulating factor 2, granulocyte-macrophage*, une cytokine typiquement produite par les cellules Th17 (375)). En revanche, les cellules Th1 expriment préférentiellement *CTBP2* (important dans la régulation de la mitose (376)), le transducteur de signaux *SMAD2* (qui médie les signaux liés au TGF- $\beta$  (377)) et le régulateur des centrosomes *NEK2* (378) (Fig. 12 G, J). Ces résultats suggèrent que les cellules à profil Th1Th17 pourraient être plus susceptibles à l'apoptose médiée par la protéine virale *Tat* étant donné leur expression de *PTEN*.

#### 4.2.2.5 Cytosquelette

Les gènes plus fortement exprimés dans les cellules Th1Th17 comparativement aux cellules Th1 incluent ceux codant pour la protéine *ANK1/SPH1* liant l'actine et la protéine tyrosine *PTPN13/FAP1* (*Fas-associated phosphatase*) qui déphosphoryle le récepteur *Fas* et est donc impliquée dans la régulation de la susceptibilité à l'apoptose (379). Les cellules Th1 expriment quant à elles de plus hauts niveaux des ARNm codant pour la cadhérine *CDH1* et la protéine tyrosine kinase *PTK2/FAK1* qui favorise le recrutement de la taline qui renforce les contacts cellule-cellule (380, 381) (Fig. 12H).

#### 4.2.2.6 Apoptose et réponse au stress

Parmi les gènes liés à ces deux fonctions cellulaires, les cellules Th1Th17 expriment préférentiellement de nombreux gènes déjà cités dans d'autres voies dont *FASLG* et *PTEN* qui peuvent tous deux induire la mort cellulaire (356, 382), mais aussi la caspase 4 (*CASP4*, l'activation séquentielle des caspases induit l'apoptose (383)), le facteur de transcription *ATF5* (*activating transcription factor 5*, induit entre autres par un manque en acides aminés et l'exposition à l'arsenite (384)), l'effecteur de l'apoptose *PERP* (interagit avec la protéine pro-

apoptotique p53 et agit comme un suppresseur de tumeur (385)), le récepteur TNFRSF25 et la protéine kinase MAP3K4 (*mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4*, impliquée dans l'apoptose induite entre autres par les stress osmotiques et les ultraviolets (386)). Comparativement aux cellules Th1Th17, les cellules Th1 surexpriment les gènes BCL2L14/BCLG (dont l'expression favorise l'apoptose (387)), la protéine ZNF443 (*zinc finger*) liée à l'apoptose due à l'irradiation (369) et DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*, un médiateur de la mort cellulaire induite par l'IFN- $\gamma$  (388)) (Fig. 12 K, L). Ces profils d'expression indiquent différents potentiels de réponse au stress et de contrôle de l'apoptose, les cellules à polarisation Th1Th17 semblant plus susceptibles à l'apoptose que les cellules Th1 étant donné le nombre et l'importance des molécules liées à l'induction de cette voie plus fortement exprimées par les Th1Th17.

#### 4.2.2.7 Signaux de transduction

La carte de chaleur *Gene Ontology* des molécules impliquées dans les signaux de transduction reprend beaucoup des gènes déjà cités, mais aussi de nombreuses kinases pouvant influencer la sensibilité des cellules à divers signaux. Notamment, les cellules Th1Th17 expriment à de plus hauts niveaux les ARNm des kinases MAPKAPK2/MK2 (*mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2*, importante pour la sécrétion de TNF- $\alpha$  et IL-6 et pour le développement des réponses inflammatoires (389)), RAPGEF3/Epac1 (*exchange protein activated by cAMP*, dont l'expression pourrait favoriser l'adhésion des cellules (390)) et HIPK2 (*homeodomain interacting protein kinase 2*, un régulateur positif du suppresseur de tumeur p53 (391)). D'un autre côté, les cellules à polarisation Th1 expriment préférentiellement les ARNm des kinases GRK5 (*G protein-coupled receptor kinase 5*, dont l'expression inhibe l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (392)) et CNKSR2/KSR2 (*kinase suppressor of Ras 2*), un autre régulateur négatif de la voie NF- $\kappa$ B (393) (Fig. 12 I). Ainsi, comparativement aux cellules Th1Th17, les cellules à polarisation Th1 semblent moins propices à l'activation et à la transduction des signaux de la voie NF- $\kappa$ B, voie favorisant la réplication du VIH (section 1.10.1).

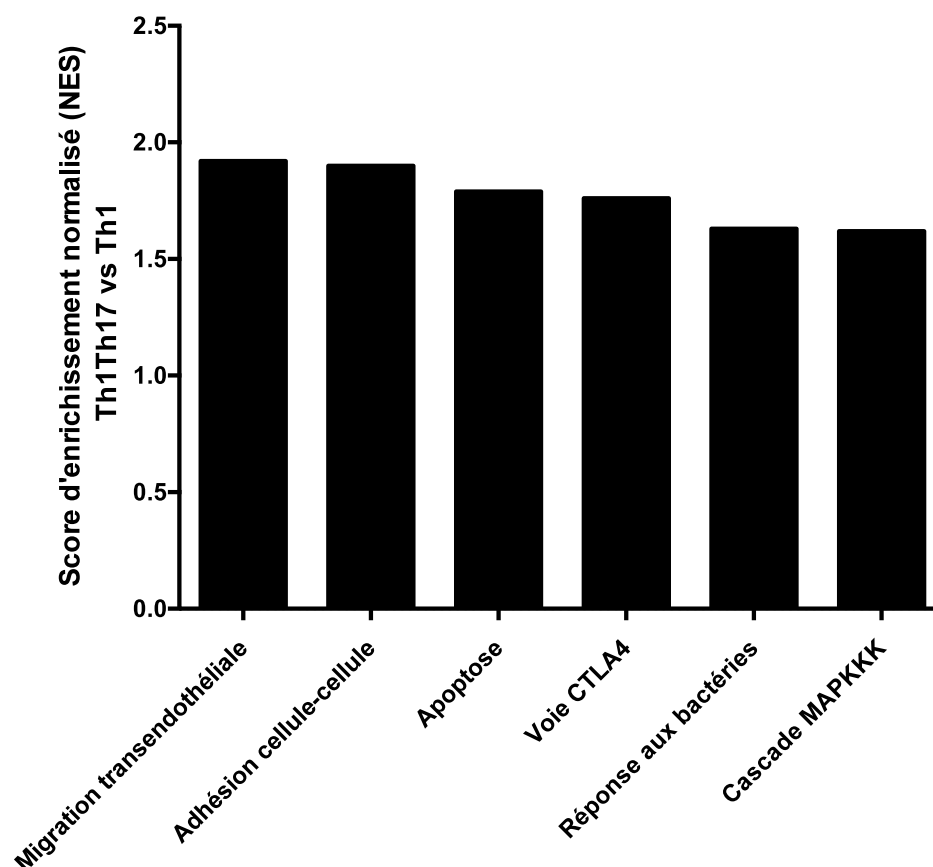
#### 4.2.2.8 Protéolyse

Les cellules Th1Th17 se distinguent des cellules Th1 par leur expression de certains gènes liés à la protéolyse, incluant les cathepsines (familles de protéases dont certaines peuvent cliver

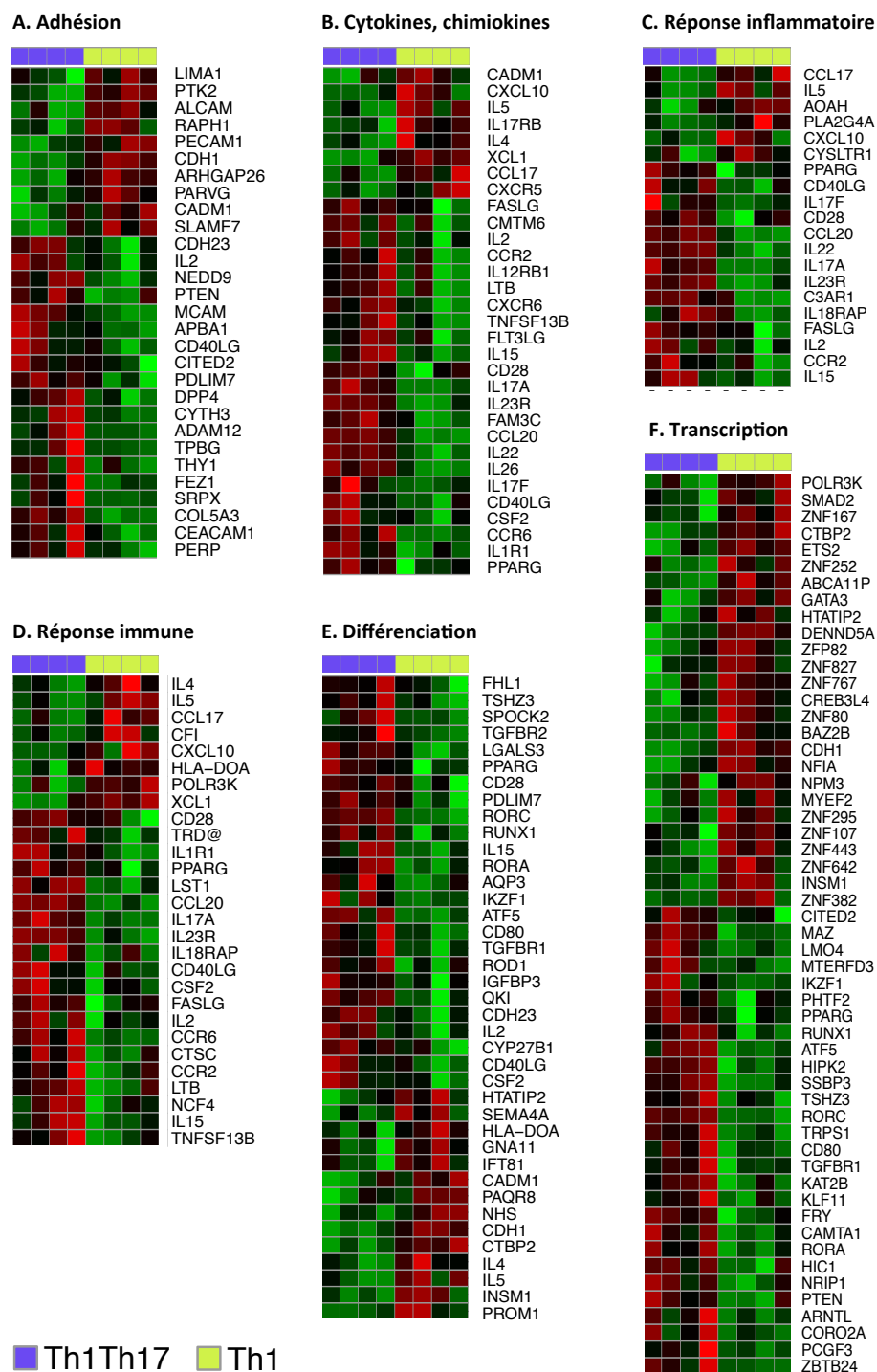


les protéines d'enveloppe du VIH (394)) CTSC et CTSH ainsi que la pro-protéine convertase FURIN (responsable du clivage de la polyprotéine gp160 du VIH en gp120 et gp41 (16)) ( $p = 0.039$ , FC = 1.61) qui sont plus fortement transcrits dans les cellules Th1Th17, alors que SENP8/NEDP1 (indirectement associé à l'activité de l'ubiquitine E3 ligase culline 4A connue pour s'associer à la protéine virale Vpr pour médier l'arrêt de la phase G2 du cycle cellulaire (395)) fait partie des gènes préférentiellement transcrits dans les cellules à polarisation Th1 (Fig. 12 M).

## Figures - Section 4.2.1



**Figure 11. Fonctions biologiques et voies de signalisation différemment exprimées dans les cellules Th1Th17 versus Th1 déterminées par *Gene Set Enrichment Analysis*.** Les niveaux d'expression de 38 113 ensembles de sondes des cellules Th1Th17 et Th1 provenant de quatre donneurs non-infectés par le VIH ont été obtenus par biopuces ADNc Affymetrix. Ces résultats ont été utilisés pour une recherche dans les collections de base de données MsigDB (*Molecular Signature Database*, Broad Institute) C2, C3 et C5. Les collections C2 et C5 ont révélé plusieurs fonctions biologiques et voies de signalisation différemment exprimées dans les cellules Th1Th17 versus Th1 ( $p < 0.05$  dans GSEA). Parmi celles-ci, six ont été sélectionnées sur la base de leur score d'enrichissement normalisé (NES) et de leur intérêt potentiel dans le contexte de l'infection à VIH.



**Figure 12. Fonctions biologiques des gènes différemment exprimés dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1.** Les gènes différemment exprimés ( $p < 0.05$ ,  $FC > 1.3$  ou  $FC < -1.3$ ) ont été classifiés sur la base de leurs fonctions biologiques associées en utilisant *Gene Ontology* tel qu'indiqué. Les cartes de chaleurs ont été générées à l'aide du langage de programmation R et les librairies ggplot2 et pheatmap (R Core Team) en incluant les données d'expression obtenues sur les cellules Th1Th17 et Th1 de quatre donneurs différents. Pour chaque carte de chaleur, les gènes exprimés à la hausse dans les cellules Th1Th17 sont en rouge et les gènes exprimés à la baisse en vert.

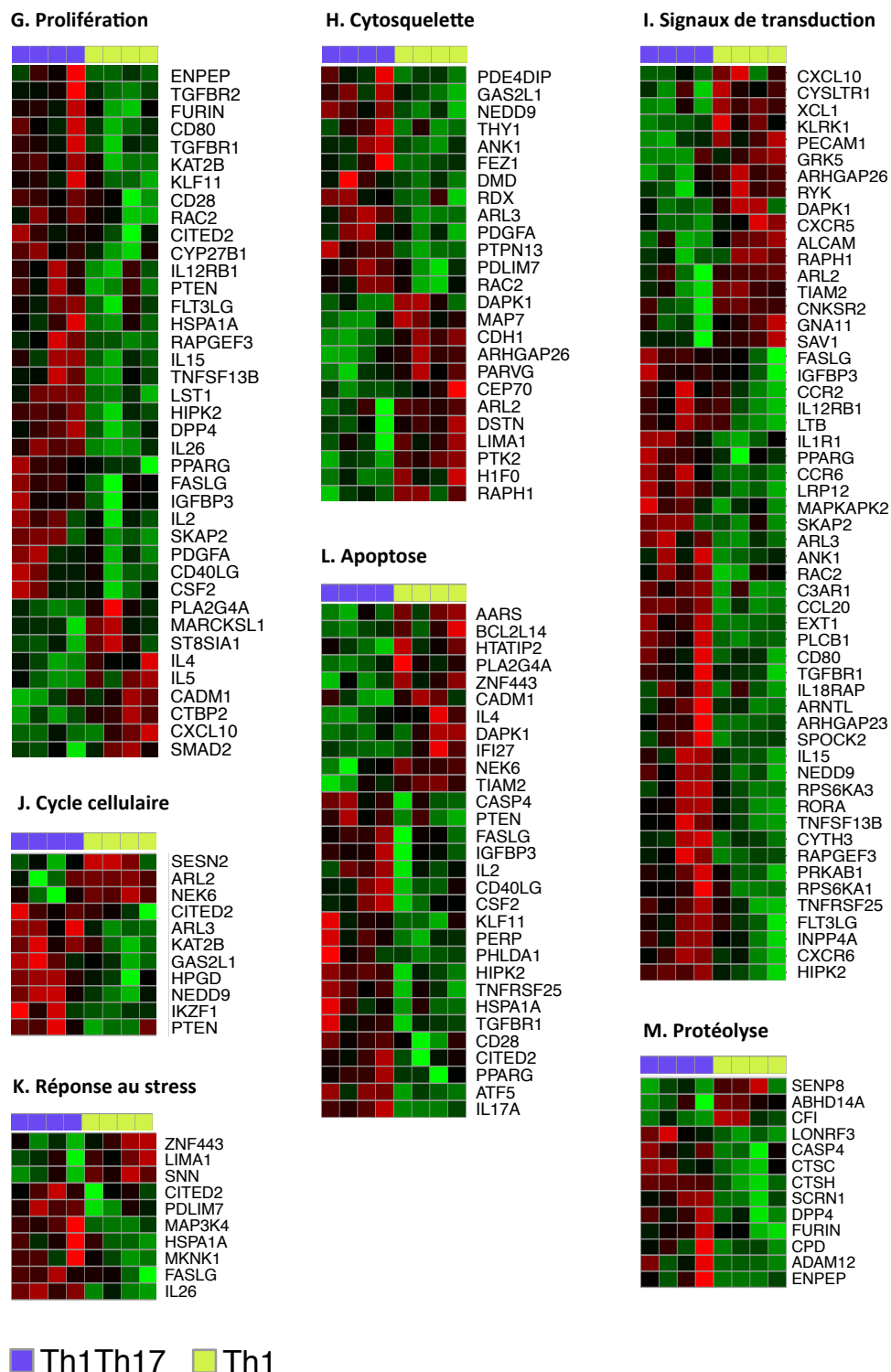


Figure 12 (suite). Fonctions biologiques des gènes différemment exprimés dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1.

### 4.2.3 Analyses par Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Les données recueillies par biopuce ont aussi été chargées dans l'application *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) dans le but de confirmer les résultats obtenus par GSEA et GO, en plus de permettre la visualisation des réseaux de gènes et des voies de signalisation différemment exprimés dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1. Pour ce faire, chaque identifiant de gène de l'ensemble des données a été lié à son objet gène correspondant dans la base de données Ingenuity (*Ingenuity Pathways Knowledge Base*) avant de procéder à l'analyse fonctionnelle révélant les voies canoniques différemment exprimées ( $p < 0.05$ ). Parmi les 37 voies canoniques significatives identifiées par IPA, nous en avons sélectionnées 21 sur la base de leur intérêt potentiel dans le contexte de l'infection par le VIH (Fig. 13A). L'analyse fonctionnelle par IPA a réaffirmé une distinction dans les profils d'expression des gènes liés aux cytokines et chimiokines (voies #2, 3, 4 à partir du haut, Fig. 13A) ainsi qu'à la différenciation des lymphocytes T auxiliaires (voie #1) et a identifié à nouveau des voies liées à la migration et l'adhésion des cellules T (voies #12, 14, 16) et à la prolifération (voies #5, 10). Plus spécifiquement, les voies de signalisation et de production de l'IL-15 (voies #7, 20) apparaissent aussi toutes deux différemment régulées dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1. La cytokine IL-15 qui fait partie de la famille de l'IL-2 stimule la prolifération et les fonctions effectrices des cellules T et NK (358). Diverses voies de signalisation sont aussi identifiées dont la voie ERK/MAPK (voie #8) liée entre autres à la division cellulaire (396), la signalisation Nur77 (voie #13) impliquée dans l'apoptose (397), la signalisation via p38 MAPK connue pour son rôle dans la sénescence due au stress (398), ainsi que la voie PKC $\theta$  (voie #15) pouvant promouvoir la différenciation des cellules T vers un profil de polarisation Th17 (399). Finalement, plusieurs voies canoniques liées à la famille PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) ou au RXR (récepteur X des rétinoïdes), deux molécules formant un complexe hétérodimère, ainsi qu'au RAR (récepteur des acides rétinoïques) sont aussi différemment régulées (voies #9, 17, 19, 21) et connues pour jouer un rôle dans la différenciation cellulaire et l'inflammation (400).

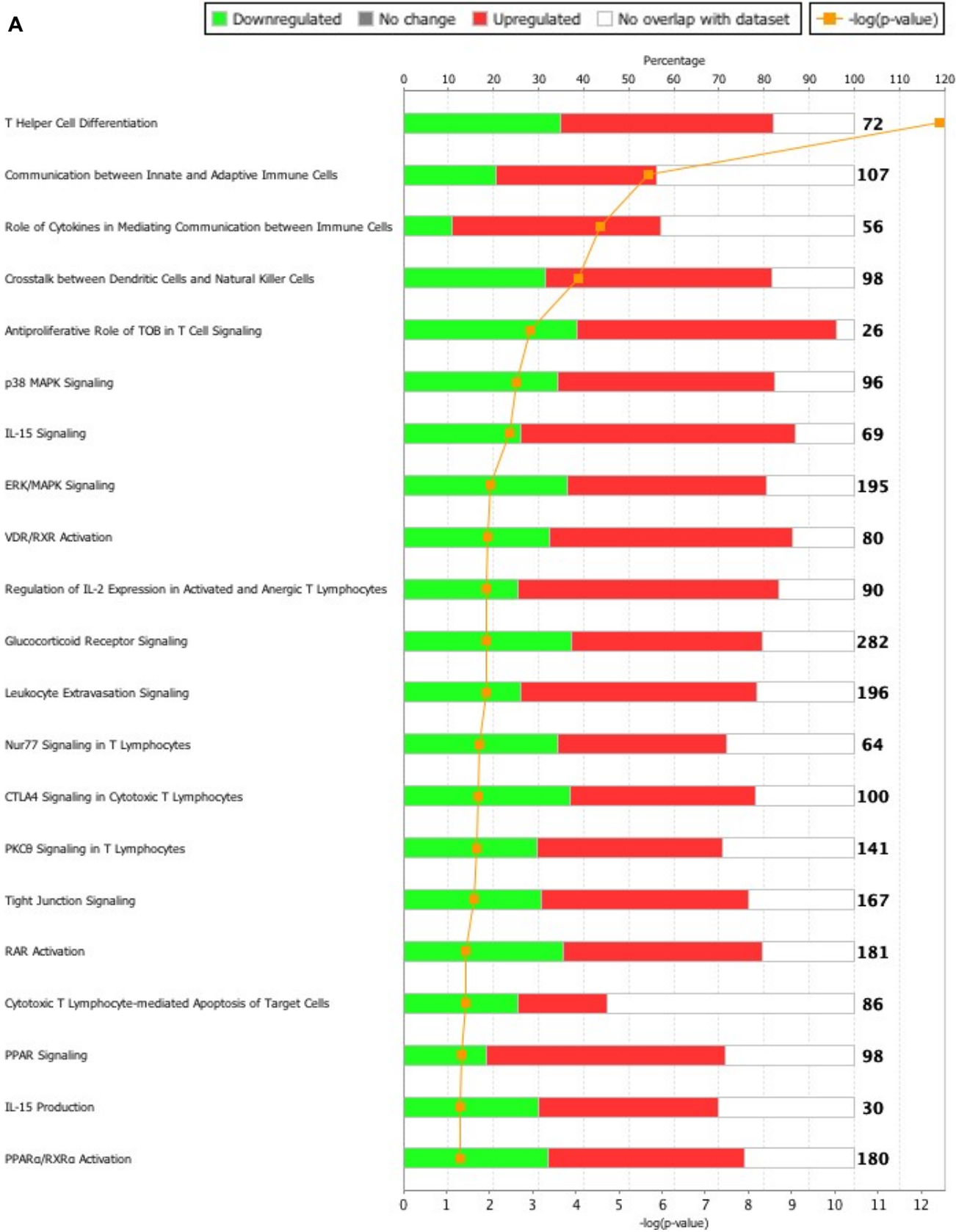
Suite à cette analyse fonctionnelle, nous avons utilisé IPA afin de superposer les résultats d'expression de gènes obtenus par biopuce, soit à des figures de voies de signalisation d'intérêt pré-existantes dans le logiciel (Fig. 13 B-C, E) soit à des réseaux moléculaires générés

algorithmiquement en fonction de leur connectivité (Fig. 13 D, F). Le schéma de différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> illustre bien l'expression différentielle des principaux marqueurs liés au profil Th17 (RORC, IL-17A, IL-17F) dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1, en plus de relever l'expression à la hausse des molécules CD28, CD40L et IL-2 pouvant résulter en une susceptibilité accrue à l'activation cellulaire et favoriser la prolifération (355) (Fig. 13B). En plus des cytokines liées au profil Th17, la figure suivante résumant l'implication des cytokines dans la médiation de la communication entre les cellules du système immunitaire fait ressortir l'expression préférentielle des interleukines IL-15, IL-22 et IL-26 dans les cellules Th1Th17 (Fig. 13C). L'IL-15 est importante pour stimuler la réponse des cellules NK (358), alors que l'IL-22 et l'IL-26 favoriseraient la réponse immunitaire au niveau des muqueuses, notamment à la muqueuse intestinale (255, 256, 401, 402).

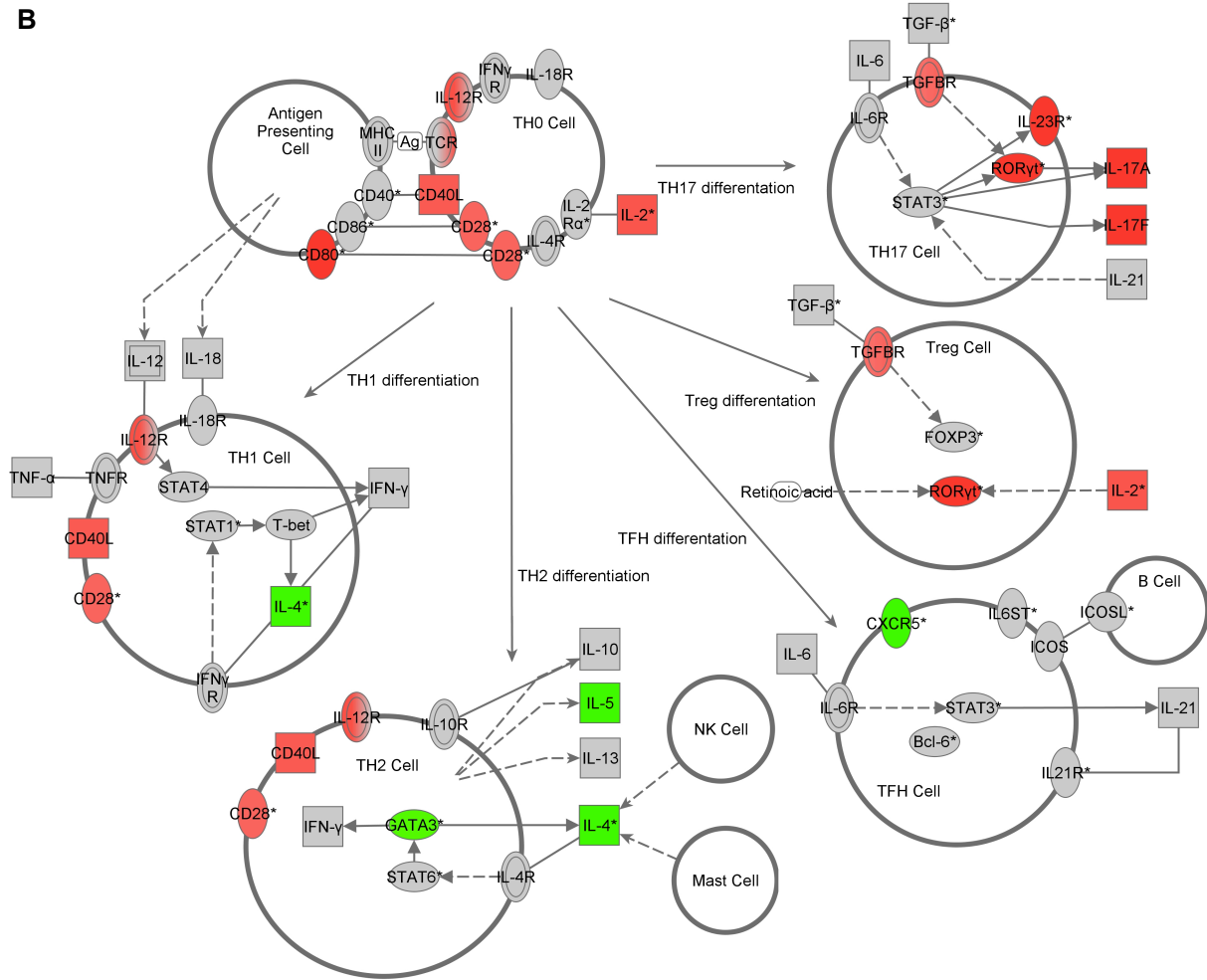
Le réseau moléculaire des principaux gènes impliqués dans l'inflammation créé à partir des gènes différemment exprimés dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 (Fig. 13D) inclut plusieurs cytokines et récepteurs à cytokines (e.g. IL-22, IL-23R, CXCL10, TNFRSF25) et reprend certaines des informations contenues dans les voies précédentes (e.g. RORC, CD80, CD40L) (Fig. 13 B-C). La majorité des molécules incluses algorithmiquement à ce réseau moléculaire sont exprimées à la hausse dans les Th1Th17 (64/87). D'intérêt, ce réseau fait aussi ressortir l'expression préférentielle dans les Th1Th17 de deux récepteurs de la famille PPAR (alpha et gamma), ainsi que du gène ARNTL (Fig. 13D, en haut à droite). Les PPAR sont des récepteurs nucléaires qui, lorsque activés, agissent comme des facteurs de transcription (403). Comme le montre la voie de signalisation des PPARs (Fig. 13E), PPAR $\alpha$  est entre autres impliqué dans le métabolisme des acides gras, alors que PPAR $\gamma$  joue un rôle dans la différenciation des adipocytes et le métabolisme du glucose. PPAR $\gamma$  est toutefois aussi connu pour ses propriétés anti-inflammatoires (359) et plus récemment pour sa capacité à diminuer la réplication du VIH dans les macrophages (404). Quant au gène ARNTL (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like*), il serait impliqué dans le maintien du rythme circadien via notamment son interaction avec le gène CLOCK (364) (Fig. 13F). Cependant, des travaux de Wang *et al.* indiquent aussi des interactions directes ou indirectes entre les PPARs, ARNTL et AhR (*aryl hydrocarbon receptor*) (405), un récepteur cytoplasmique dont l'activation favorise la différenciation des lymphocytes T vers le profil Th17 (406).

Figures - Section 4.2.2

A



B

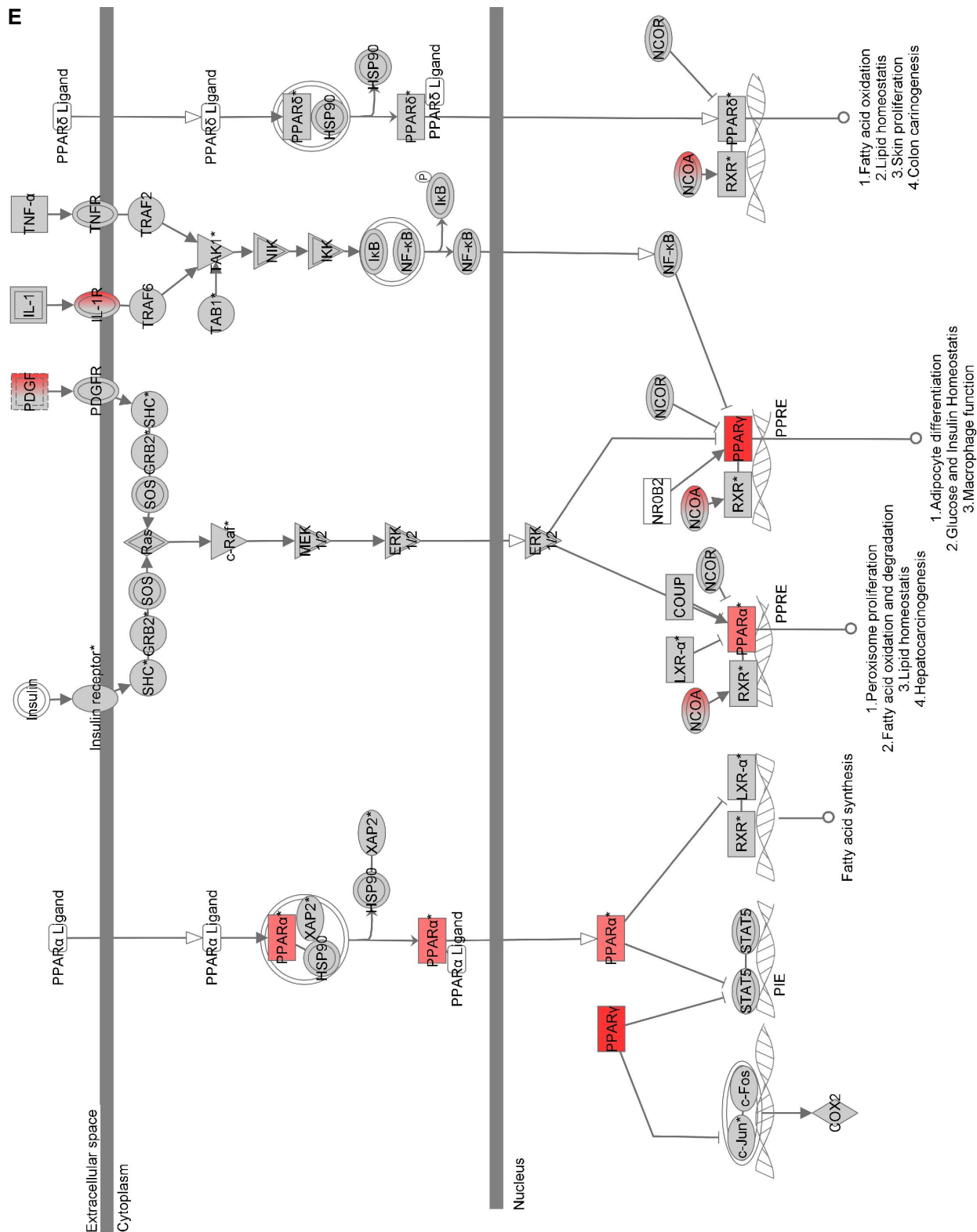


**Figure 13. Voies canoniques et réseaux moléculaires différemment exprimées dans les cellules Th1Th17 versus Th1 déterminés par Ingenuity Pathway Analysis.** Les niveaux d'expression de 38 113 ensembles de sondes dans les cellules Th1Th17 et Th1 de quatre donneurs non infectés par le VIH ont été obtenus par biopuces Affymetrix. Ces résultats ont été téléchargés vers le logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, Ingenuity Systems Inc.) où chaque identifiant de gène a été lié à son objet gène correspondant dans la base de données Ingenuity. **A.** L'analyse fonctionnelle a identifié les voies canoniques différemment exprimées ( $p < 0.05$ ) face à l'ensemble des données. Parmi celles-ci, 21 ont été sélectionnées sur la base de leur valeur  $p$  et de leur intérêt potentiel dans le contexte de l'infection à VIH. L'axe des x représente les pourcentages de gènes régulés à la hausse (en rouge), à la baisse (en vert) ou absents de l'ensemble des sondes (en blanc) chez les Th1Th17 versus Th1, ainsi que le  $-\log(p\text{-value})$  calculé par le test exact de Fisher d'extrémité droite (en orange) pour chaque voie canonique. Les nombres adjacents à chaque voie canonique représentent le nombre total de gènes qui y sont inclus. **(B-F)** Les résultats obtenus par biopuces ont été superposés à des réseaux moléculaires développés à partir des informations contenues dans Ingenuity sous la forme de voies de signalisation pré-existantes dans la base de données ou de réseaux d'interactions générés algorithmiquement à partir d'un gène d'intérêt sélectionné. Les gènes exprimés à la hausse (en rouge) ou à la baisse (en vert) dans les cellules Th1Th17 versus Th1, les gènes détectés avec différence non significative (en gris) et les gènes exprimés de façon identique ou non présents sur la biopuce (en blanc). **B.** Gènes associés à la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> vers les profils de polarisation Th1, Th2, Th17, Treg et Tfh.









**Figure 13 (suite). Voies canoniques et réseaux moléculaires différemment exprimés dans les cellules Th1Th17 versus Th1 déterminés par *Ingenuity Pathway Analysis*. E. Voie de signalisation *via* le facteur de transcription PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*).**



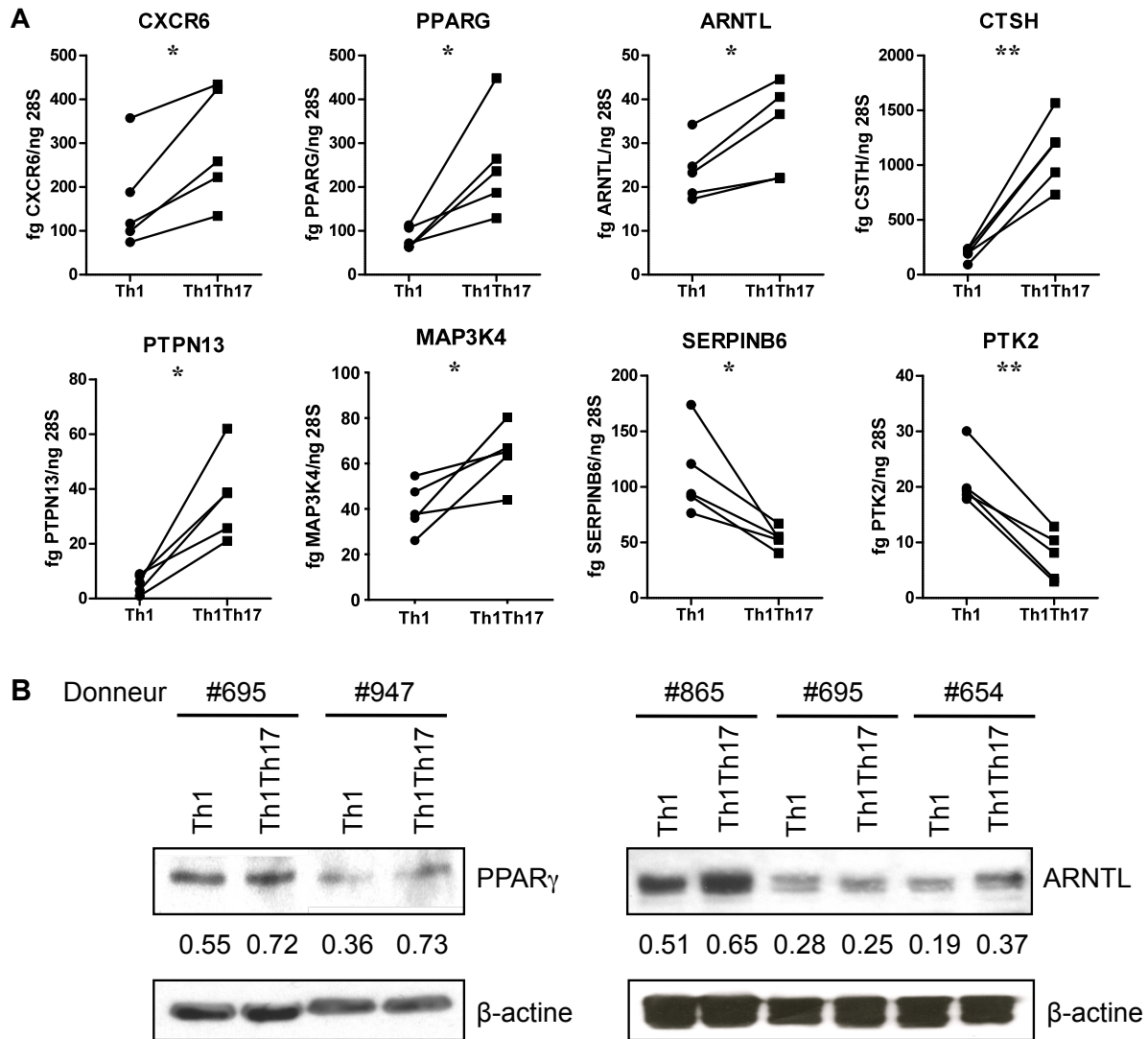
### 4.3 Validation de l'expression différentielle des gènes dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1

La RT-PCR en temps réel a été utilisée pour quantifier l'expression au niveau de l'ARNm de huit gènes différemment exprimés selon les analyses des données de biopuce. Nous avons ainsi validé l'expression préférentielle des ARNm de CXCR6, PPAR $\gamma$ , ARNTL, CTSH, PTPN13 et MAP3K4 dans les cellules Th1Th17 et inversement, l'expression préférentielle des ARNm de SERPINB6 et PTK2 dans les cellules à polarisation Th1 (test t de Student non apparié,  $p < 0.05$ ) (Fig. 14A). Parallèlement aux analyses utilisant des biopuces de technologie Affymetrix, des études utilisant des biopuces de type Illumina (Illumina Inc., San Diego, CA, États-Unis) ont aussi été menées au laboratoire (section 4.2, résultats non montrés) et ont identifié le gène ISG20 comme préférentiellement exprimés dans les cellules Th1 *versus* Th1Th17 chez 5 donneurs non infectés par le VIH. Ces résultats étant différents de ceux obtenus par Affymetrix, nous avons clarifié l'expression différentielle de l'ARNm d'ISG20 par RT-PCR en temps réel et ainsi validé son expression préférentielle dans les cellules Th1 (Fig. supplémentaire 1).

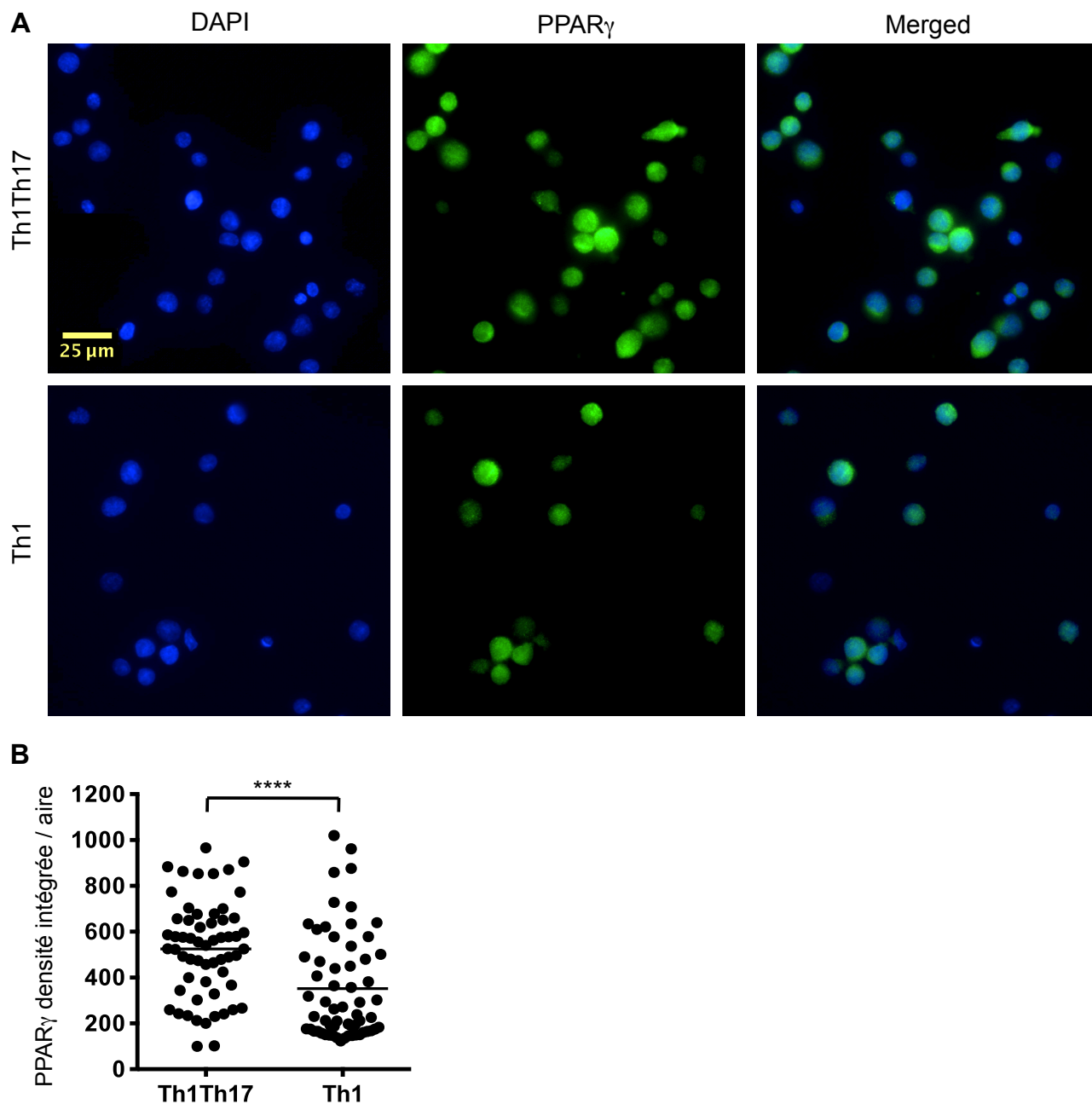
Suite à la validation de l'expression au niveau de l'ARNm, nous avons sélectionné deux gènes d'intérêt particulier pour validation au niveau des protéines par immunobuvardage. Pour ARTNL, nous avons observé une certaine variabilité selon les donneurs, avec deux donneurs sur trois présentant une plus forte expression dans les cellules Th1Th17. Les résultats sur PPAR $\gamma$  obtenus de deux donneurs semblent quant à eux confirmer l'expression préférentielle de cette molécule dans les cellules Th1Th17 (Fig. 14B). Toutefois, étant donné les faibles niveaux d'expression d'ARNTL et de PPAR $\gamma$  dans les deux sous-populations lymphocytaires à l'étude, les expériences d'immunobuvardage ont nécessité de fortes concentrations de lysats cellulaires. Les cellules Th1Th17 et Th1 triées par cytométrie en flux étant dispendieuses et limitées en nombre ainsi qu'en donneurs, nous avons donc subséquemment favorisé une technique de quantification de l'expression des protéines par microscopie confocale à fluorescence pour confirmer l'expression différentielle de PPAR $\gamma$ . Conformément aux résultats sur biopuce et aux mesures par RT-PCR en temps réel et immunobuvardage, la visualisation par microscopie après marquage PPAR $\gamma$  a démontré l'expression préférentielle de PPAR $\gamma$  dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 chez 3 donneurs (test t de Student non apparié,  $p < 0.05$ ) (Fig. 15).

Finalement, étant donné notre intérêt pour ARNTL et son interaction potentielle avec le récepteur AhR, nous avons aussi mesuré l'expression d'AhR aux niveaux de l'ARNm et des protéines (Fig. supplémentaire 2). Tel que dans les données obtenues par biopuce, nous n'avons pas observé de différence significative d'expression entre les Th1Th17 et les Th1 pour ce gène, mais nous avons constaté une grande variabilité d'expression entre les donneurs, autant au niveau de l'ARNm que des protéines.

Figure – Section 4.3



**Figure 14. Validation de l'expression différentielle des gènes d'intérêt dans les cellules Th1Th17 versus Th1.** Les cellules Th1Th17 et Th1 triées de donneurs non-infectés par le VIH ont été stimulées via CD3/CD28 durant 3 jours. **A.** L'ARN total a été extrait avec une trousse d'extraction de Qiagen. Les RT-PCR quantitatives en temps réels ont été réalisées sur LightCycler 480 II (Roche) à l'aide de la trousse *QuantiTect SYBR Green RT PCR* et des amorces spécifiques (Qiagen). La quantification a été réalisée par rapport à une courbe standard générée avec de l'ADNc de chaque transcrit. L'expression relative de chacun des gènes a été normalisée par rapport aux niveaux d'ARN ribosomal 28S. Les résultats d'expression de l'ARNm de cinq donneurs différents et les valeurs du test t de Student apparié sont indiquées (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ) pour chaque gène. **B.** En parallèle, des cellules ont été lysées et la concentration des lysats en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford. 40  $\mu$ g de protéines par puits ont été utilisés pour un immunobuvardage sur gel d'acrylamide. Après transfert sur membranes PVDF, celles-ci ont été exposées à des Acs anti-PPAR $\gamma$  ou anti-ARNTL. La révélation est faite par dosage de la chimioluminescence (ECL Plus, GE Healthcare) sur film photographique. L'expression de la  $\beta$ -actine est utilisée comme contrôle afin de calculer l'intensité relative à l'aide du logiciel GelEval v1.35, tel qu'indiqué sous chaque bande.



**Figure 15. Validation de l'expression différentielle de PPAR $\gamma$  dans les cellules Th1Th17 versus Th1 par microscopie confocale.** Les cellules triées et activées comme décrit dans la légende de la Figure 14 ont été fixées sur une lame de microscopie et marquées par un Acs anti-PPAR $\gamma$  puis par un Acs secondaire couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488. Un marquage des noyaux par DAPI (*ProLong Gold Antifade with DAPI*, Invitrogen) a ensuite été réalisé. Les cellules ont été observées en microscopie confocale à fluorescence (Axio Observer.Z1 Cell Observer®, Carl Zeiss). **A.** Les images ont été obtenues à l'aide du logiciel AxioVision 4.8.2. (Carl Zeiss) avec un grossissement à 40X. **B.** Les niveaux de fluorescence de 60 cellules Th1Th17 et Th1 ont été mesurés via le logiciel ImageJ (NIH) et la valeur du test t de Student non apparié est indiquée (\*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ ). (**A**, **B**) Les résultats présentés sont obtenus sur 1 donneur et sont représentatifs de  $n=3$ .



#### **4.4 Rôle de PPAR $\gamma$ dans l'infection par le VIH-1**

Nous avons déterminé que le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  est préférentiellement exprimé dans les cellules à polarisation Th1Th17 (sections 4.2 et 4.3), des cellules hautement permissives à la réplication du VIH, comme démontré au laboratoire (227). Étant donné les rôles de PPAR $\gamma$  dans la différenciation vers le profil Th17 (et Th1Th17) (362) et dans la diminution de la réplication du VIH dans les macrophages (404), nous avons sélectionné ce gène pour une étude de ses implications potentielles dans le contrôle de la réplication du VIH au niveau des lymphocytes T CD4+, particulièrement dans les cellules à profil Th1Th17.

##### **4.4.1 La rosiglitazone est un agoniste de PPAR $\gamma$ dans les cellules T CD4+ mémoires**

Afin de déterminer les effets de l'activation de la voie de signalisation PPAR $\gamma$  sur l'infection par le VIH, nous avons d'abord validé l'utilisation de la rosiglitazone (RGZ) comme agoniste de cette voie dans notre contexte expérimental à la concentration choisie (50 $\mu$ M, choisie sur la base des effets sur l'activation de la voie et en absence d'effets délétères sur la viabilité cellulaire). PPAR $\gamma$  est un récepteur nucléaire de type 2 et est localisé au noyau de façon prédominante. Toutefois, l'équilibre entre l'exportation et l'importation nucléaire de ce récepteur est influencée par son interaction avec ses ligands, dont font partie la RGZ (330, 407). Ainsi, pour observer l'activation de la voie par la rosiglitazone, nous avons d'abord mesuré l'expression cytoplasmique et nucléaire de PPAR $\gamma$  en microscopie confocale à fluorescence (Fig. 16A). En visualisant le noyau cellulaire par coloration DAPI et l'expression de PPAR $\gamma$  dans un autre canal de fluorescence dans le cadre d'observations multiples dans l'axe Z à un grossissement de 100X pour chaque cellule analysée, nous avons pu quantifier le ratio d'expression de PPAR $\gamma$  au noyau *versus* dans la cellule totale. Nous avons observé que la culture des cellules en présence de RGZ (50 $\mu$ M) durant 20 heures augmente de près de 25% la proportion de PPAR $\gamma$  localisé au noyau (Fig. 16B), illustrant l'activation de la voie de signalisation. Pour confirmer que cet effet est induit par la RGZ *via* PPAR $\gamma$ , nous avons comparé ces résultats avec des cellules cultivées en présence de RGZ et de T0070907, un inhibiteur spécifique de PPAR $\gamma$  (331). L'ajout de T0070907 permet d'inhiber l'effet de la RGZ et donc de retrouver des ratios de localisation nucléaire similaires aux cellules non traitées.

Fait à noter, les cellules traitées avec la RGZ apparaissent plus petites et forment moins d'agrégats cellulaires sur lame que les cellules contrôle ou que celles cultivées avec la RGZ et le T0070907 simultanément (Fig. 16A). Or, l'activation de PPAR $\gamma$  est entre autres liée à une inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IFN- $\gamma$  (408) et à une diminution de l'expression de l'intégrine ICAM-1 (409) importante pour la formation des agrégats de cellules T médiée par l'activation cellulaire (410). Aussi, pour nos observations en microscopie, nous n'avons pas ajouté d'IL-2 aux milieux de culture au moment de l'ajout de la RGZ. Or, la RGZ est connue pour inhiber la production d'IL-2, une cytokine importante pour la prolifération et l'activation (411). Nos observations morphologiques représentent ainsi une confirmation supplémentaire de l'activation de la voie PPAR $\gamma$  par la RGZ résultant en une diminution de l'activation cellulaire et de l'inflammation.

#### **4.4.2 L'activation de la voie PPAR $\gamma$ inhibe la réplication du VIH dans les cellules T CD4+ mémoires totales et dans les cellules à polarisation Th1Th17**

Dans les macrophages, l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  permet une diminution de la réplication du VIH en modulant l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (404). Afin d'établir si l'activation de PPAR $\gamma$  dans les cellules T CD4+ permet une inhibition semblable de la réplication du VIH, nous avons dans un premier temps isolés des lymphocytes T CD4+ mémoires que nous avons exposés au VIH puis cultivés en présence ou en absence de RGZ. Les cinétiques de réplication virale mesurées par quantification de la protéine p24 du VIH dans les surnageant de cultures indiquent une forte inhibition ( $\geq 60\%$ ) de la réplication virale dans ces cellules par le traitement avec la RGZ (Fig. 17A), et ce dans le contexte d'infections avec de faibles (13ng p24/10<sup>6</sup> cellules) ou de fortes doses (50ng p24/10<sup>6</sup> cellules) de virus. Les niveaux d'intégration de l'ADN viral au génome cellulaire mesurés par PCR en temps réel à jour 3 post-infection sont non significativement distincts entre les cellules contrôle et celles cultivées en présence de RGZ (Fig. 17B), ce qui suggère que la RGZ n'influence pas ou peu l'intégration du génome viral et agit plutôt à des niveaux post-intégration. Les niveaux d'intégration à jour 14 correspondent quant à eux à de nombreux cycles d'infection, ils sont donc influencés par la production virale des premiers cycles d'infection et reflètent la réplication observée à jour 14 par la cinétique correspondante.

Dans un deuxième temps, nous avons isolés des cellules T CD4+ mémoires à polarisation

Th1Th17 pour déterminer si l'inhibition de la réplication du VIH observée dans les cellules T CD4+ mémoires totales y est similaire. Nous avons observé une inhibition de la réplication allant jusqu'à 36% à jour 12 post-infection en présence de RGZ (Fig. 17C) et des niveaux d'intégration à jour 12 diminués de façon semblable (Fig. 17D). Ainsi, il semble que l'activation de la voie PPAR $\gamma$  par la RGZ permet de diminuer l'infection par le VIH dans les cellules T CD4+ mémoires totales et aussi plus particulièrement au sein de la sous-population à profil Th1Th17 qui représentent des cellules très permissives à l'infection par le VIH et exprimant PPAR $\gamma$  (sections 4.1 et 4.3). Toutefois, la plus faible inhibition de la réplication du VIH par la RGZ mesurée dans les cellules Th1Th17 ( $\leq 36\%$ ) comparativement aux cellules T CD4+ mémoires ( $\geq 60\%$ ) suggère que l'inhibition de la réplication médiée par l'activation de PPAR $\gamma$  dans ces cellules est en partie contrebalancée par des facteurs de permissivité à l'infection qui sont différemment exprimés par les différentes sous-populations lymphocytaires.

Finalement, pour valider le rôle de PPAR $\gamma$  comme régulateur négatif de la réplication du VIH dans les cellules T CD4+ mémoires, nous avons observé les effets de l'inhibition de PPAR $\gamma$  sur la réplication virale à l'aide de l'interférence ARN. La cinétique d'expression de PPAR $\gamma$  suite à la stimulation via CD3/CD28 (Fig. 18A) a d'abord été déterminée chez plusieurs donneurs pour sélectionner un moment propice à la transfection avec les ARN interférents (ARNi) tout en tenant compte du protocole d'infection au jour 3 post-stimulation CD3/CD28 et de la durée de l'interférence. L'efficacité de l'interférence ARN dirigée contre PPAR $\gamma$  (siPPAR $\gamma$ ) comparativement à des cellules transfectées avec un ARN contrôle non spécifique (siNT) a été mesurée au niveau des ARNm au moment correspondant à l'exposition au VIH (Fig. 18B, 76% de diminution de l'expression). L'interférence contre PPAR $\gamma$  résulte en une augmentation significative de la réplication du VIH tel que mesurée à jour 3 post-infection (Fig. 17C, panneau de gauche). Les mesures d'intégration du génome viral sont quant à elles similaires, ce qui tend à confirmer l'hypothèse selon laquelle l'activation de PPAR $\gamma$  inhibe principalement le cycle de réplication virale à des niveaux post-intégration (Fig. 18C, panneau de droite). Cependant, la courte durée d'efficacité de l'interférence ARN et la mortalité cellulaire associée à la transfection ne permettent pas de réaliser des cinétiques d'infection jusqu'à jour 12 dans ce système. Pour ce faire, nous avons souhaité employer l'inhibiteur spécifique T0070907 afin d'obtenir une inhibition prolongée de PPAR $\gamma$ . Or, la concentration de T007907 nécessaire (10 $\mu$ M) à l'inhibition de PPAR $\gamma$  et/ou à la restauration des niveaux d'activité basale de PPAR $\gamma$

en présence de RGZ dans nos cellules s'avère causer trop de mortalité cellulaire à partir de 48 heures d'exposition pour être considérée (résultats non montrés).

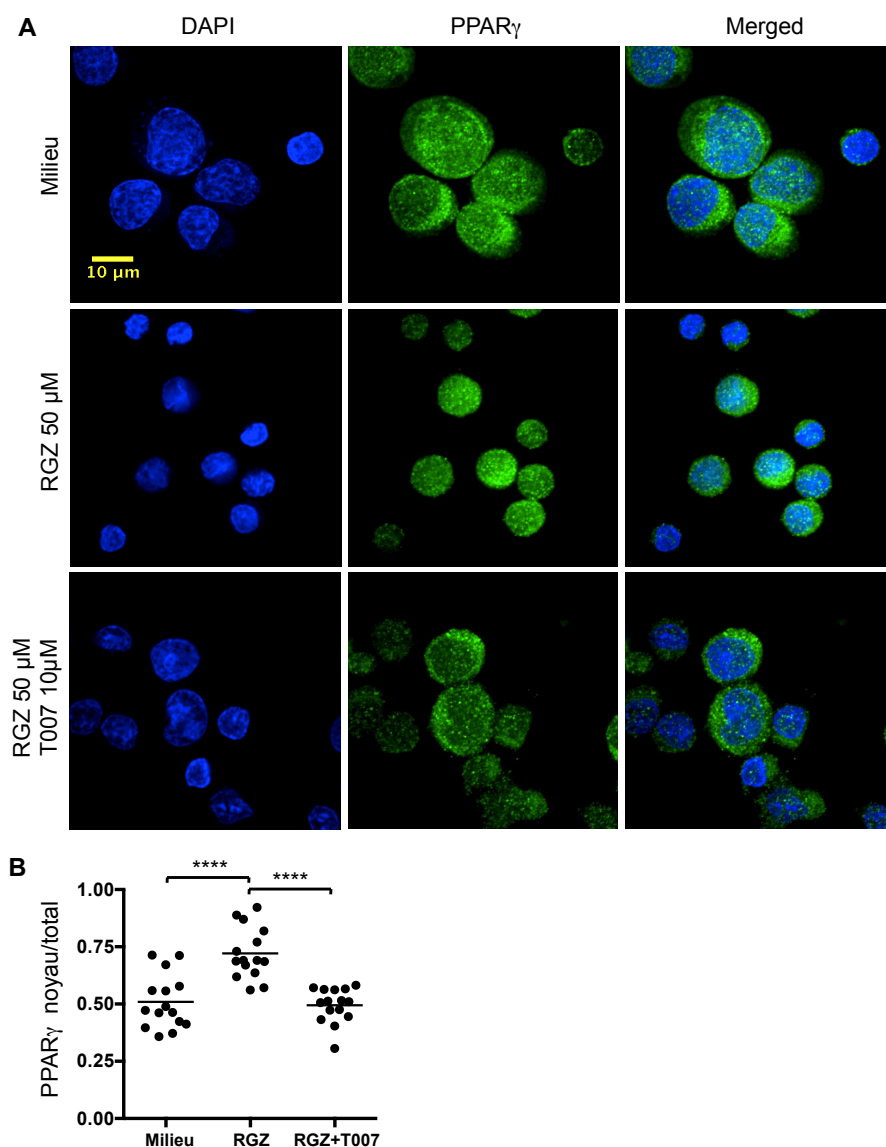
#### **4.4.3 Rôle de PPAR $\gamma$ dans la réponse immunitaire**

Les résultats présentés aux Figures 17 et 18 indiquent le rôle de PPAR $\gamma$  dans l'inhibition de la réplication du VIH. Dans ce contexte, nous avons d'abord considéré les effets de la concentration utilisée de RGZ (50 $\mu$ M) sur la viabilité, la prolifération et l'expression du récepteur CD4 et co-récepteur du VIH CCR5 chez les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires à l'aide de la cytométrie en flux (Fig. 19A). Les statistiques sur plusieurs donneurs montrent que la culture des cellules en présence de RGZ à 50 $\mu$ M ne cause pas de changement dans les proportions de cellules viables et de prolifération (Fig. 19B). Il est à noter que l'activation de PPAR $\gamma$  est déjà connue comme inhibant la production d'IL-2, une cytokine importante pour la prolifération cellulaire (411). Toutefois, PPAR $\gamma$  n'interfère pas avec la capacité des cellules à répondre à l'IL-2 exogène. Or, dans notre contexte expérimental, afin de comparer ces résultats à nos données d'infection, de l'IL-2 a été ajoutée aux milieux de culture en même temps que l'ajout de la RGZ. Ces observations sur la prolifération sont donc applicables à nos expériences d'infection, mais ne sont probablement pas représentatives des effets de la RGZ en absence d'ajout d'IL-2. L'expression du CD4 et du CCR5 ne sont pas non plus influencées par la RGZ dans ce contexte (Fig. 19B). Nous concluons donc que nos mesures de l'inhibition de la réplication virale par l'activation de PPAR $\gamma$  ne sont pas dues à des comptes cellulaires significativement différents (hormis la mortalité induite par la réplication du virus et non par la présence directe de RGZ), ni à une diminution de l'expression du récepteur CD4 et/ou du co-récepteur CCR5 importants pour l'entrée du virus dans les cellules, ce qui correspond à notre hypothèse selon laquelle PPAR $\gamma$  inhibe principalement la réplication à un niveau post-intégration.

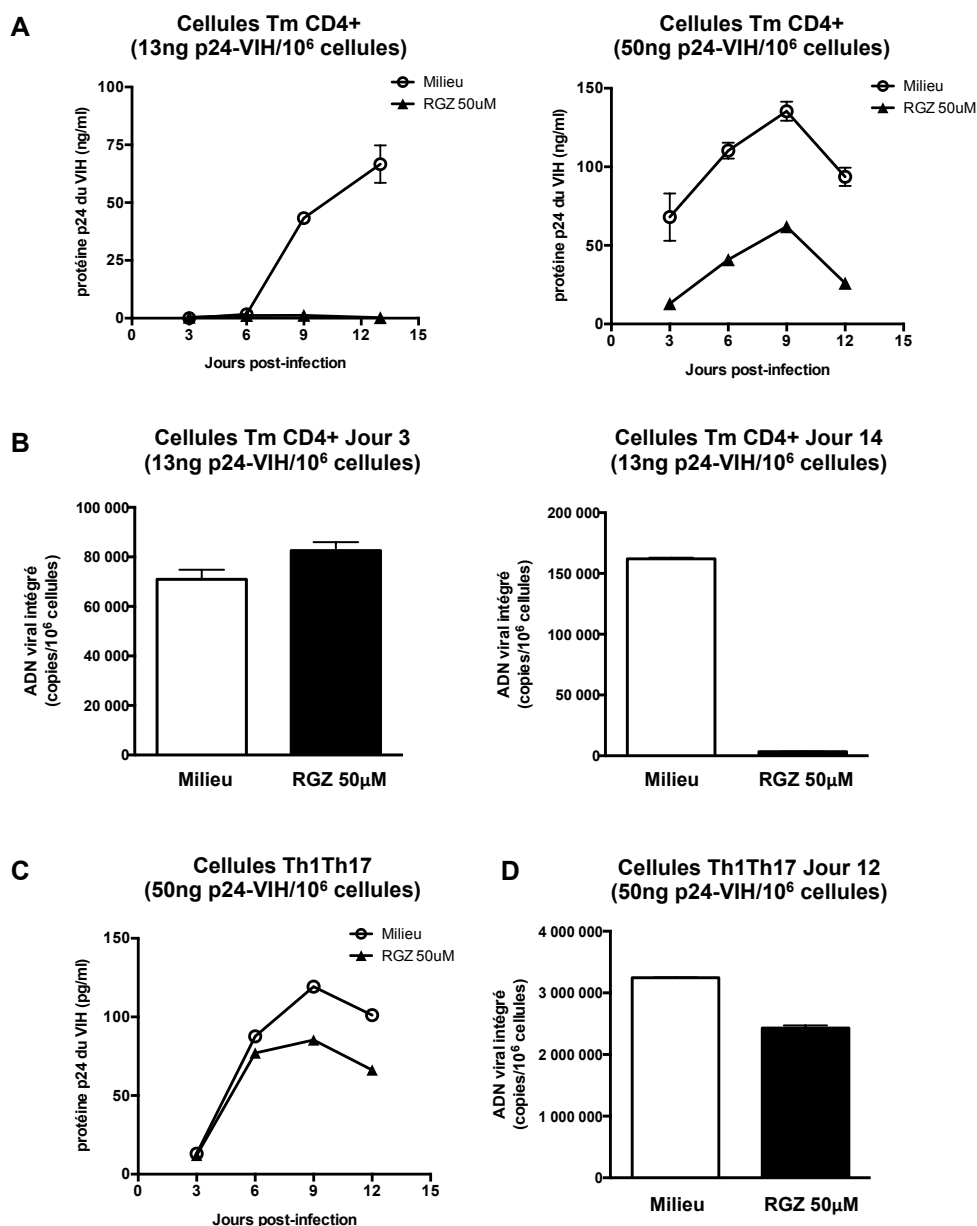
Nous avons ensuite déterminé les effets de la RGZ sur la production de cytokines pro-inflammatoires, celles-ci pouvant favoriser l'activation cellulaire et donc la susceptibilité à l'infection par le VIH (412). Nos études étant basées sur la permissivité différentielle au VIH des cellules à profil Th1Th17 *versus* Th1, nous avons quantifié la production d'IL-17 (liée aux profils Th1Th17 et Th17) et d'IFN- $\gamma$  (lié aux profils Th1Th17 et Th1) (sous-sections 1.9) des cellules T CD4<sup>+</sup> cultivées en présence de RGZ. L'ajout de la RGZ en même temps (Fig. 20A)

ou après la stimulation des cellules via CD3/CD28 (Fig. 20B) mène au bout de trois jours à une tendance à la baisse de la production d'IL-17 et également à une baisse significative de la production d'IFN- $\gamma$ , ce qui pourrait corrélérer avec un moindre niveau d'activation cellulaire en présence de RGZ.

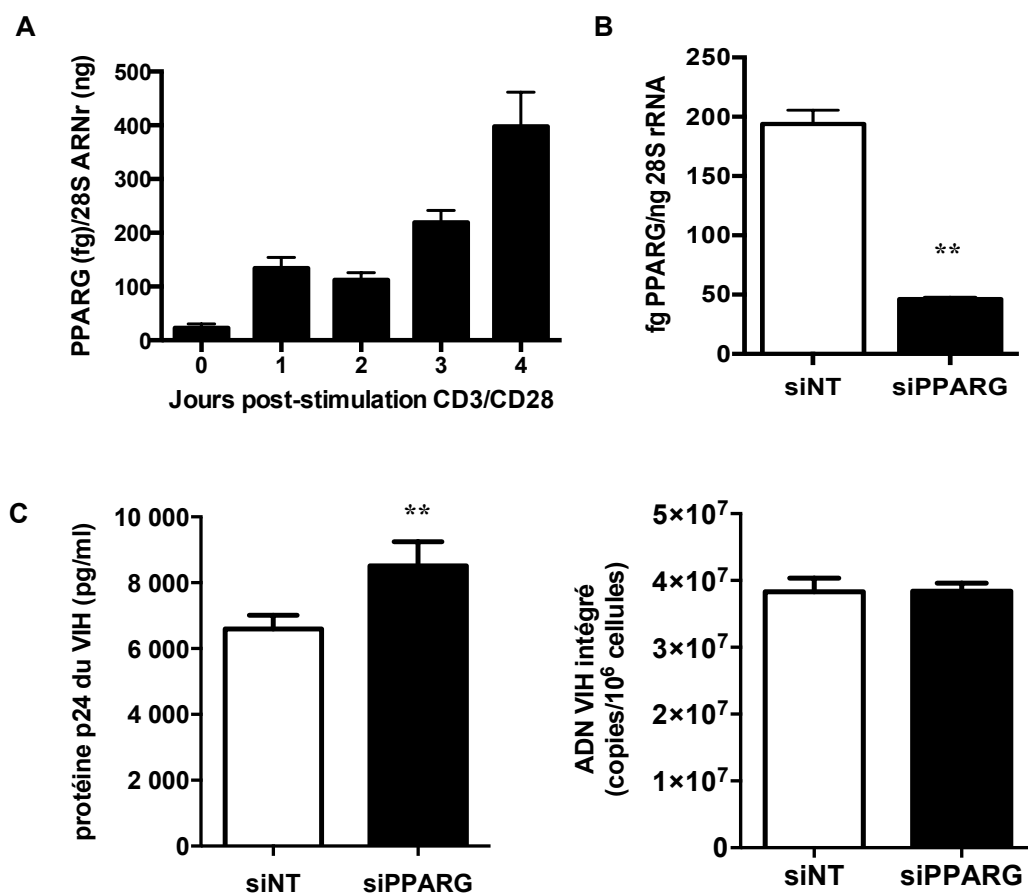
## Figures – Sections 4.4.1 à 4.4.3



**Figure 16. Validation des effets de la rosiglitazone et de l'inhibiteur T007907 sur l'expression et la localisation de PPAR $\gamma$  dans les cellules T CD4 $^{+}$  mémoires.** Des cellules T CD4 $^{+}$  mémoires isolées par sélection négative en utilisant des billes magnétiques ont été stimulées via CD3/CD28 durant 3 jours, puis mises en culture en présence de rosiglitazone (RGZ) 50 $\mu$ M et/ou de T007907 (T007) 10 $\mu$ M durant 20h. Les cellules ont été lavées et fixées sur une lame de microscopie pour marquage par un Acs anti-PPAR $\gamma$  puis par un Acs secondaire couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488. Un marquage des noyaux par DAPI (*ProLong Gold Antifade with DAPI*, Invitrogen) a ensuite été réalisé. Les cellules ont été observées en microscopie confocale à fluorescence (Axio Observer.Z1 Cell Observer®, Carl Zeiss) à des grossissements de 40 et 100X, ainsi qu'en coupe en Z à 100X. **A.** Les images ont été obtenues à l'aide du logiciel AxioVision 4.8.2. (Carl Zeiss) avec un grossissement à 100X. **B.** Les niveaux de fluorescence de 15 cellules (ratio de fluorescence PPAR $\gamma$  noyau/cellule totale) ont été mesurés via le logiciel ImageJ (NIH) et la valeur *p* du test *t* de Student non apparié est indiquée (\*\*\*\* *p* ≤ 0.0001). Les résultats présentés sont obtenus sur 1 donneur et sont représentatifs de *n*=3.

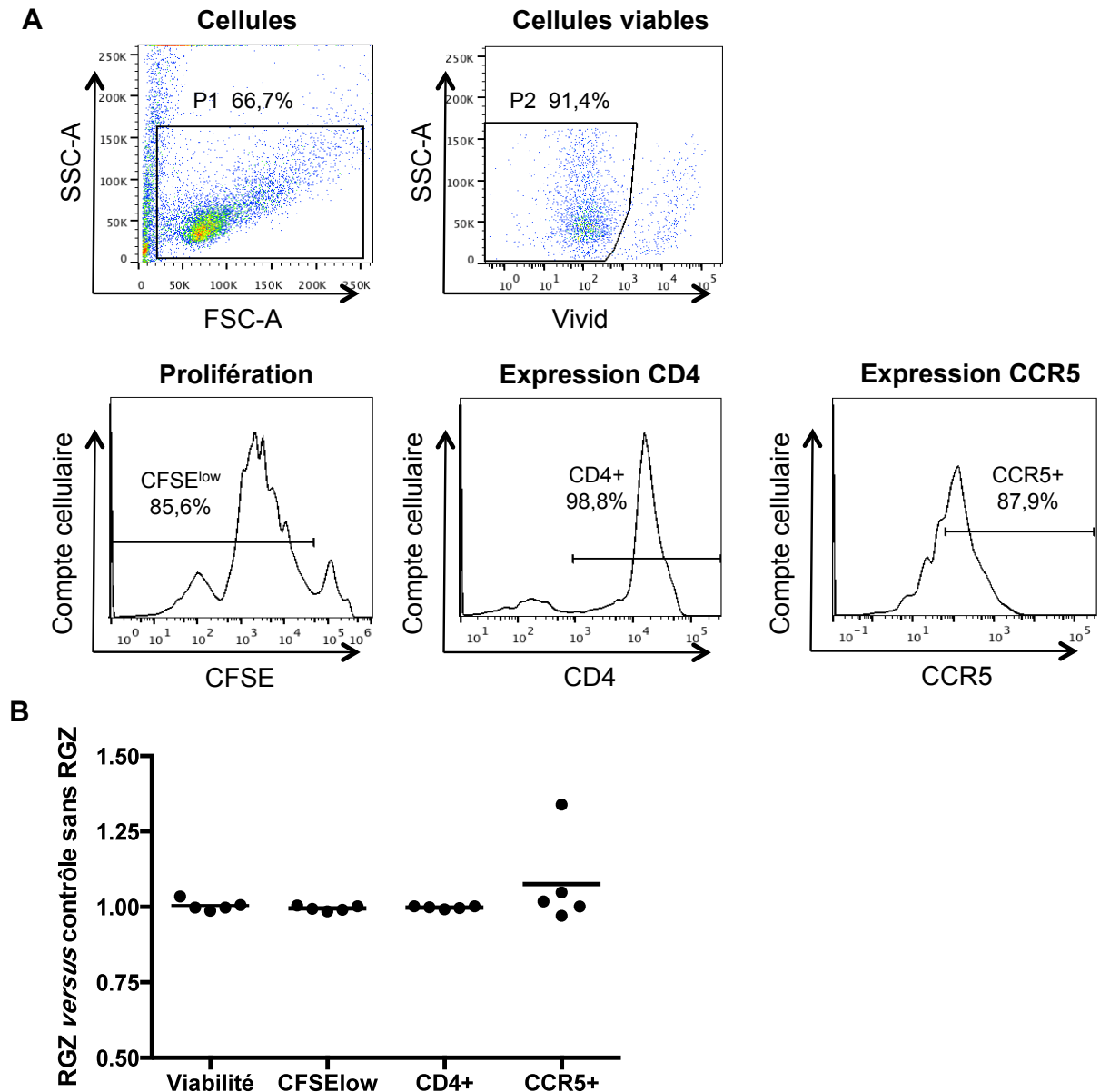


**Figure 17. Effet de l'activation de la voie PPAR $\gamma$  sur la susceptibilité à la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires totaux et les cellules à polarisation Th1Th17.** Les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires isolées par sélection négative à l'aide de billes magnétiques ou les cellules à profil de polarisation Th1Th17 isolées par FACS ont été stimulées 3 jours via CD3/CD28. Les cellules ont ensuite été exposées au HIV durant 3 heures à 37°C avant d'être mises en culture en présence d'IL-2 (5 ng/ml) avec ou sans la rosiglitazone (50  $\mu$ M). **A, C.** La réplication du VIH est mesurée par ELISA de la protéine p24 dans les surnageants de culture récupérés à jour 3, 6, 9 et 12 ou 13 post-infection. **B, D.** L'intégration de l'ADN viral est mesurée par PCR quantitative en temps réel à jour 3 et/ou 12 ou 14 post-infection. **(A-B)** Les cellules sont infectées avec un virus de tropisme R5 (NL4.3BAL) à 13ng ou 50ng de la protéine p24 du VIH/10<sup>6</sup> cellules ou **(C-D)** avec un virus de tropisme R5 (NL4.3BAL) sans la protéine virale Nef à 50ng de la protéine p24 du VIH/10<sup>6</sup> cellules. **(A-D)** Les résultats sont représentatifs d'expériences réalisées sur des cellules provenant de deux donneurs différents.

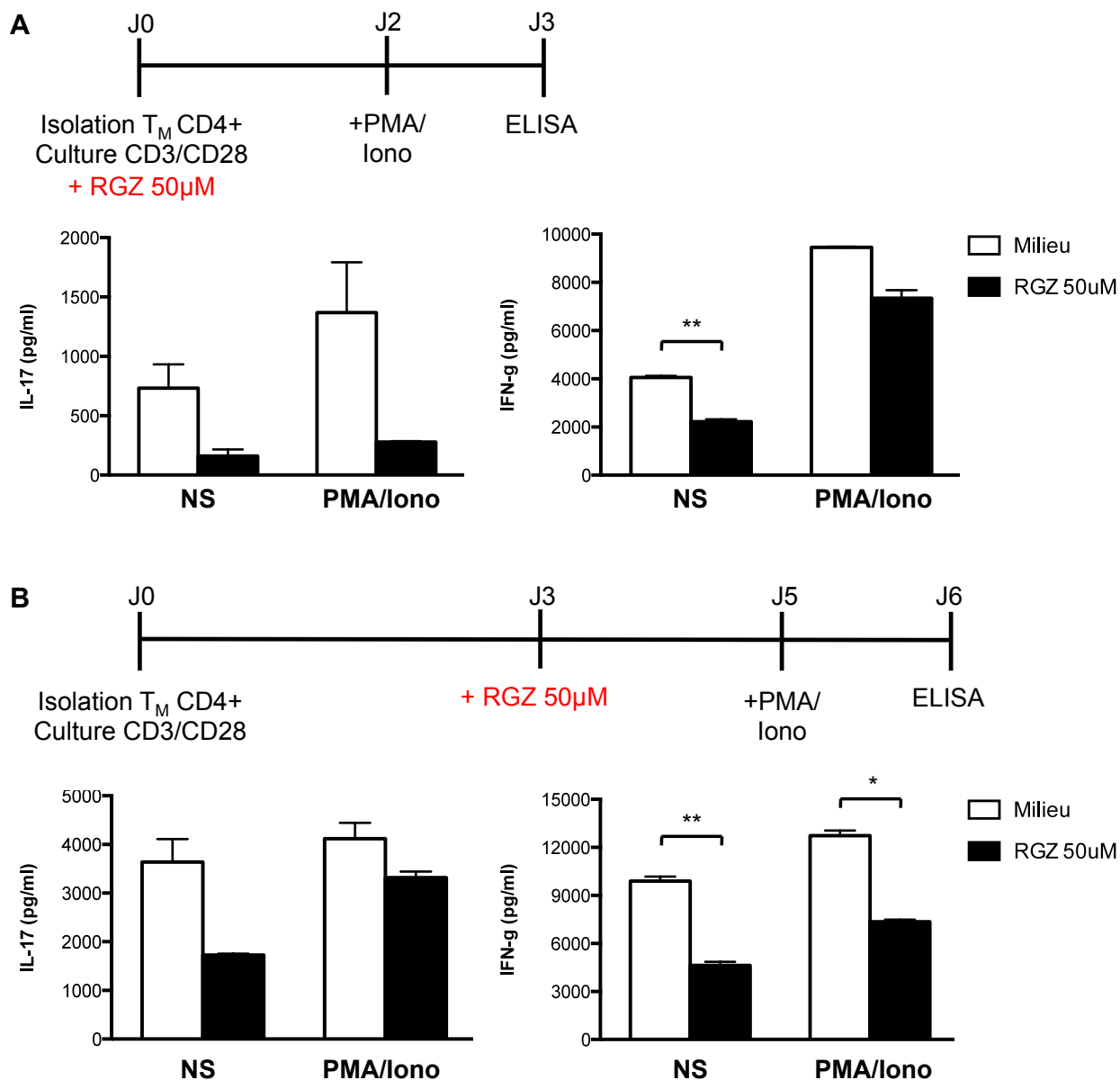


**Figure 18. Effet de l'inhibition de PPAR $\gamma$  par ARN interférence sur la réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires.** **A.** Des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires ont été recueillies après de 0 à 4 jours de stimulation CD3/CD28, l'ARN total a été extrait et l'ARNm de PPAR $\gamma$  a été quantifié par RT-PCR en temps réel afin de déterminer la cinétique d'expression des transcrits PPAR $\gamma$ . L'expression relative de PPAR $\gamma$  a été normalisée par rapport aux niveaux d'ARN ribosomal 28S. **B-C.** Les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires ont été stimulées via CD3/CD28 durant 2 jours avant d'être nucléofectées avec un ARN interférant (ARNi) dirigé contre PPAR $\gamma$  (siPPARG) ou un ARNi non spécifique (siNT, *non targeting siRNA*) (Dharmacon) en utilisant le dispositif Nucleofector II (Lonza). Les cellules nucléofectées ont ensuite été cultivées en présence d'IL-2 (5ng/ml) durant 24h avant d'être exposées au VIH durant 3h à 37°C. Après lavage, les cellules ont été remises en culture (IL-2, 5ng/ml). **B.** Des cellules ont été recueillies 24h après nucléofection et l'ARN total a été extrait pour mesurer l'efficacité de l'interférence ARN par RT-PCR en temps réel. **C.** La réplication du VIH à 3 jours post-infection a été mesurée par quantification ELISA de la protéine p24 du VIH dans les surnageants (panneau de gauche). Les niveaux d'ADN viral intégré ont été quantifiés par PCR en temps réel et normalisé relativement aux niveaux d'expression de CD3 (panneau de droite). Les cellules ont été infectées avec un virus à tropisme R5 (NL4.3BAL) à 50ng de p24/10<sup>6</sup> cellules. **(B, C)** Les valeurs du test t de Student non apparié sont indiquées (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ). **(A-C)** Les résultats sont représentatifs d'expériences réalisées sur des cellules provenant de deux donneurs différents non infectés par le VIH.





**Figure 19. Effets de la rosiglitazone sur la viabilité, la prolifération polyclonale et l'expression des récepteurs CD4 et CCR5.** Les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires isolées par sélection négative à l'aide billes magnétiques ont été chargées en CFSE (0.5  $\mu$ M) et stimulées via CD3/CD28 durant 3 jours. Les cellules ont ensuite été exposées à l'IL-2 (5ng/ml) en présence ou en absence de rosiglitazone (RGZ, 50 $\mu$ M) durant 2 jours, puis marquées avec des Acs anti-CD4 et anti-CCR5 ainsi qu'avec le colorant de viabilité vivid avant d'être analysées par cytométrie en flux (cytomètre BD LSR II). **A.** Les cellules viables (vivid négatives, P2) sont d'abord sélectionnées, puis les pourcentages de prolifération (CFSE<sup>low</sup>) et d'expression des récepteurs CD4 et CCR5 sont déterminés. **B.** Les valeurs relatives de la viabilité, de la prolifération et de l'expression de CD4 et CCR5 des cellules cultivées en présence ou en absence de la rosiglitazone ont été analysées sur des cellules provenant de cinq donneurs différents.



**Figure 20. Effet de l'activation de PPAR $\gamma$  sur la production des cytokines proinflammatoires IL-17 et IFN- $\gamma$  par les cellules T CD4+ mémoires.** Les cellules T CD4+ mémoires ont été isolées par sélection négative en utilisant des billes magnétiques. **A.** Les cellules ont été stimulées via CD3/CD28 en présence ou en absence de rosiglitazone (50μM) durant 2 jours, puis stimulées ou non avec du phorbol-myristate acétate (PMA, 50ng/ml) et de l'ionomycine (1μg/ml) durant 24h pour induire la production de cytokines. **B.** Les cellules ont été stimulées via CD3/CD28 durant 3 jours. À jour 3, les cellules ont été cultivées en présence ou en absence de rosiglitazone (50μM) durant 2 jours supplémentaires, puis stimulées ou non par PMA/Ionomycine durant 24h. **(A, B)** Les niveaux d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  dans les surnageants de culture ont été quantifiés à l'aide des kits ELISA Ready-SET-Go!® (eBioscience). Les résultats présentés sont obtenus avec les cellules d'un donneur et sont représentatifs de deux donneurs différents. NS: non stimulées par PMA/Iono. Les valeurs du test t de Student non apparié sont indiquées lorsque significatives (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

#### 4.5 Rôle d'ARNTL et AhR dans l'infection par le VIH-1

L'expression préférentielle d'ARNTL dans les cellules à polarisation Th1Th17 *versus* Th1 (sections 4.2 et 4.3) nous a menés à l'étude du récepteur AhR de la même famille (*aryl hydrocarbon receptor*). Bien que non différemment exprimé dans les lymphocytes Th1Th17 *versus* Th1 (Fig. supplémentaire 2), ce récepteur interagit avec ARNTL (et même indirectement avec PPAR $\gamma$ ) (405) et est impliqué dans la différenciation des lymphocytes T vers le profil Th17 (406) et la dégradation protéosomale grâce à son activité E3 ligase (413). Le rôle d'AhR dans l'infection par le VIH étant alors non déterminé, nous avons choisi d'étudier les effets de cette molécule sur le contrôle de la réplication du VIH au niveau des lymphocytes T CD4+.

##### 4.5.1 L'activation de la voie AhR augmente la réplication du VIH dans les cellules T CD4+ mémoires

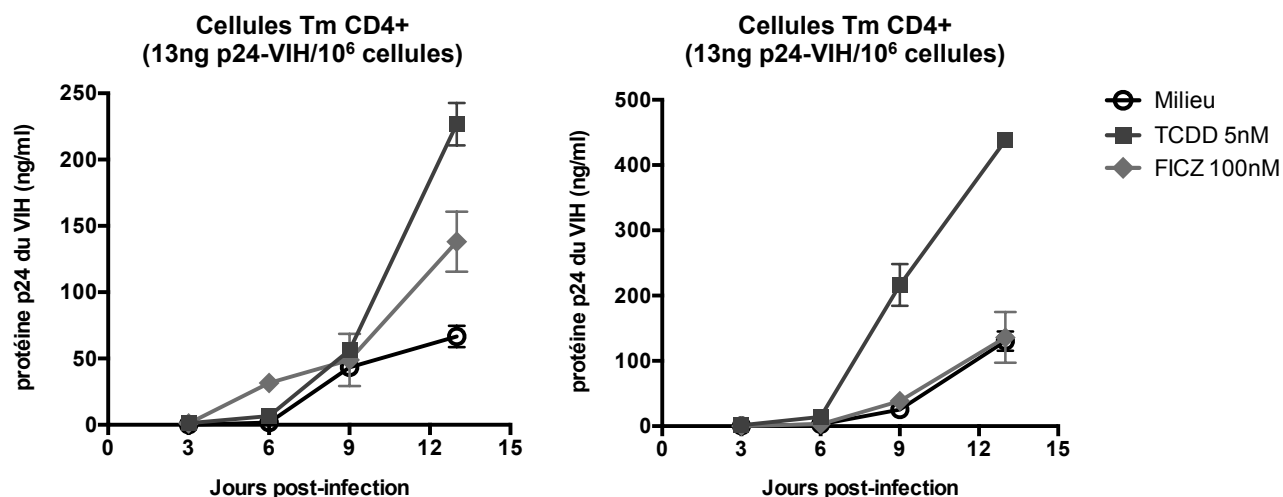
En vue d'établir si le récepteur AhR influence la réplication du VIH, nous avons isolé des lymphocytes T CD4+ mémoires que nous avons exposés au VIH puis cultivés en présence de l'un ou l'autre de deux agonistes d'AhR; le TCDD et le FICZ. Les cinétiques de réplication virale mesurées par quantification de la protéine p24 du VIH dans les surnageants de cultures montrent une forte augmentation de la réplication virale en présence de TCDD (5nM), allant jusqu'à une augmentation de 230% à 13 jours post-infection, et une augmentation atteignant 109% chez un des deux donneurs dans le cas du FICZ (100nM) (Fig. 21). Ces résultats indiquent que l'état d'activation d'AhR influence bel et bien le cycle de réplication viral et que cette molécule pourrait représenter un facteur de permissivité à l'infection par le VIH. Cet effet devrait être la conséquence de l'activation transcriptionnelle subséquente à la translocation nucléaire d'AhR.

Afin de valider cette hypothèse, des expériences d'interférence ARN ont été réalisées par Dr Patricia Monteiro, post-doctorante au laboratoire de 2008 à 2011, en utilisant la technologie de nucléofection Amaxa. L'ARN interférence dirigée contre AhR (siAhR) a permis d'en diminuer l'expression de près de 50% au niveau de l'ARNm (Fig. 22A) et de 83% au niveau protéique (Fig. 22B) comparativement aux cellules transfectées avec un ARN contrôle non spécifique (siNT1, *non-targeting siRNA*). Lorsque ces cellules ont été exposées au VIH puis mises en culture, on constate que la réplication du VIH telle que mesurée par la protéine p24 dans les surnageants est augmentée de jusqu'à 50% en présence de siAhR comparé aux cellules

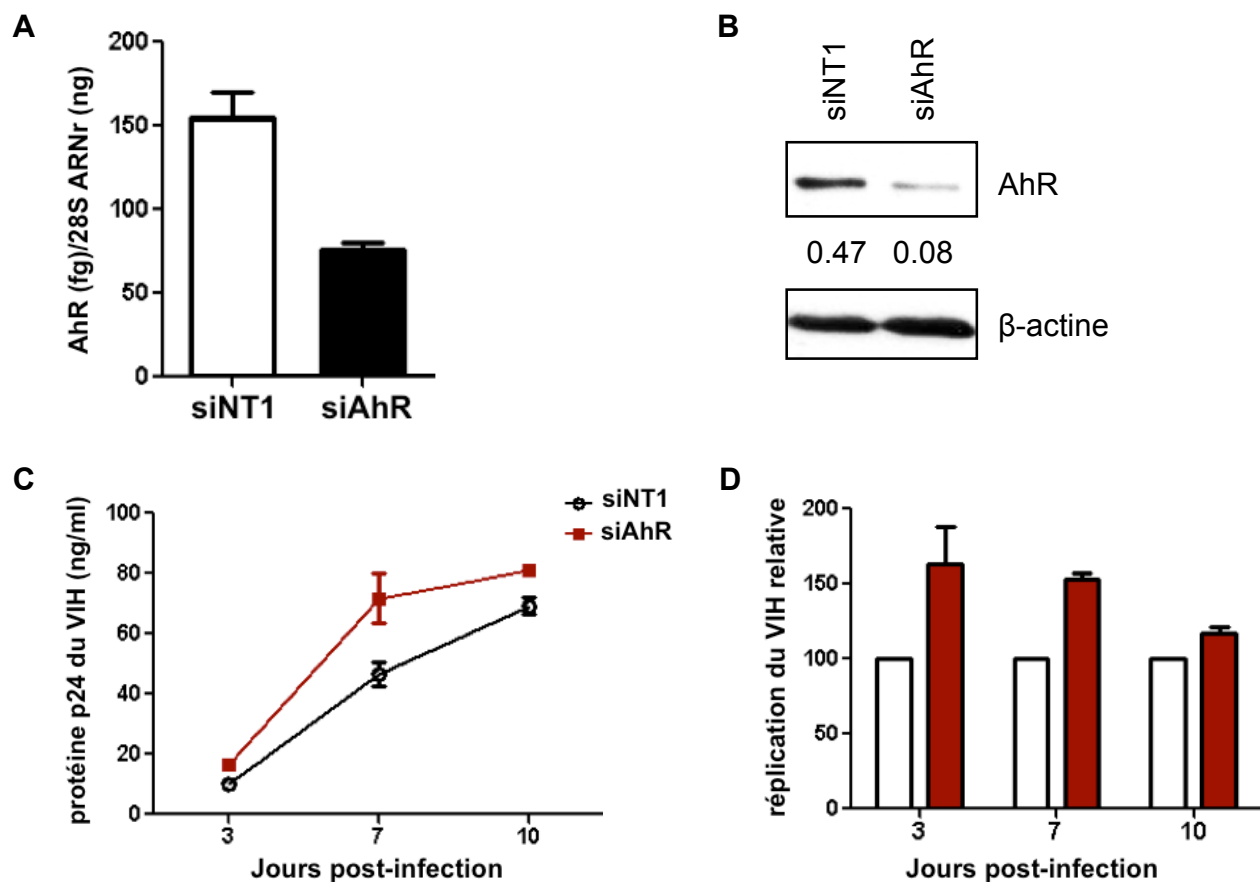
transfectées par siNT1 (Fig. 22 C-D). Ceci est en contradiction avec les résultats de la Figure 21 démontrant que l'activation de la voie AhR augmente la permissivité cellulaire au VIH. Étant donné que l'interaction d'AhR avec ses ligands TCDD et FICZ induit son transport au noyau (332), il est donc probable qu'AhR influence le cycle de réplication du VIH à plusieurs niveaux selon sa localisation cellulaire, noyau *versus* cytoplasme. Il est possible que présent dans le cytoplasme, AhR joue un rôle de facteur de restriction anti-VIH en entraînant par exemple la dégradation des particules virales, comme suggéré par sa fonction E3 ligase (413). Le double rôle d'AhR dans la régulation de la permissivité au VIH reste à approfondir de point de vue mécanistique.

Nous avons ensuite observé les effets des agonistes d'AhR aux concentrations précédemment utilisées sur la viabilité, la prolifération et l'expression du récepteur CD4 et du co-récepteur du VIH CCR5 chez les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires à l'aide de la cytométrie en flux (Fig. 23A). Les expériences réalisées sur les cellules de deux donneurs indiquent que les cellules mises en culture en présence de TCDD ou de FICZ ont des pourcentages de viabilité, de prolifération et d'expression du CD4 similaires aux cellules cultivées en absence d'un agoniste d'AhR. Pour ce qui est de l'expression du CCR5, le traitement par FICZ indique une tendance à la hausse de l'expression du CCR5 allant jusqu'à 31,2% d'augmentation et le TCDD jusqu'à 23,5% (Fig. 23B), ce qui n'a actuellement pas été documenté dans la littérature. Toutefois, il est possible que cette hausse d'expression du récepteur CCR5 s'explique en tout ou en partie par le fait que l'activation de la voie AhR favorise la différenciation vers le profil Th17 (et Th1Th17) (406), des sous-populations lymphocytaires connues pour exprimer un peu plus fortement CCR5 que les cellules à profil Th1 (227). En conclusion, l'activation d'AhR induit une forte augmentation de la réplication virale dont il est possible qu'une partie soit imputable à une augmentation de l'entrée virale via le co-récepteur CCR5. D'un autre côté, l'expression du récepteur AhR sous sa forme cytoplasmique semble plutôt permettre de limiter l'infection par un mécanisme qui reste à clarifier.

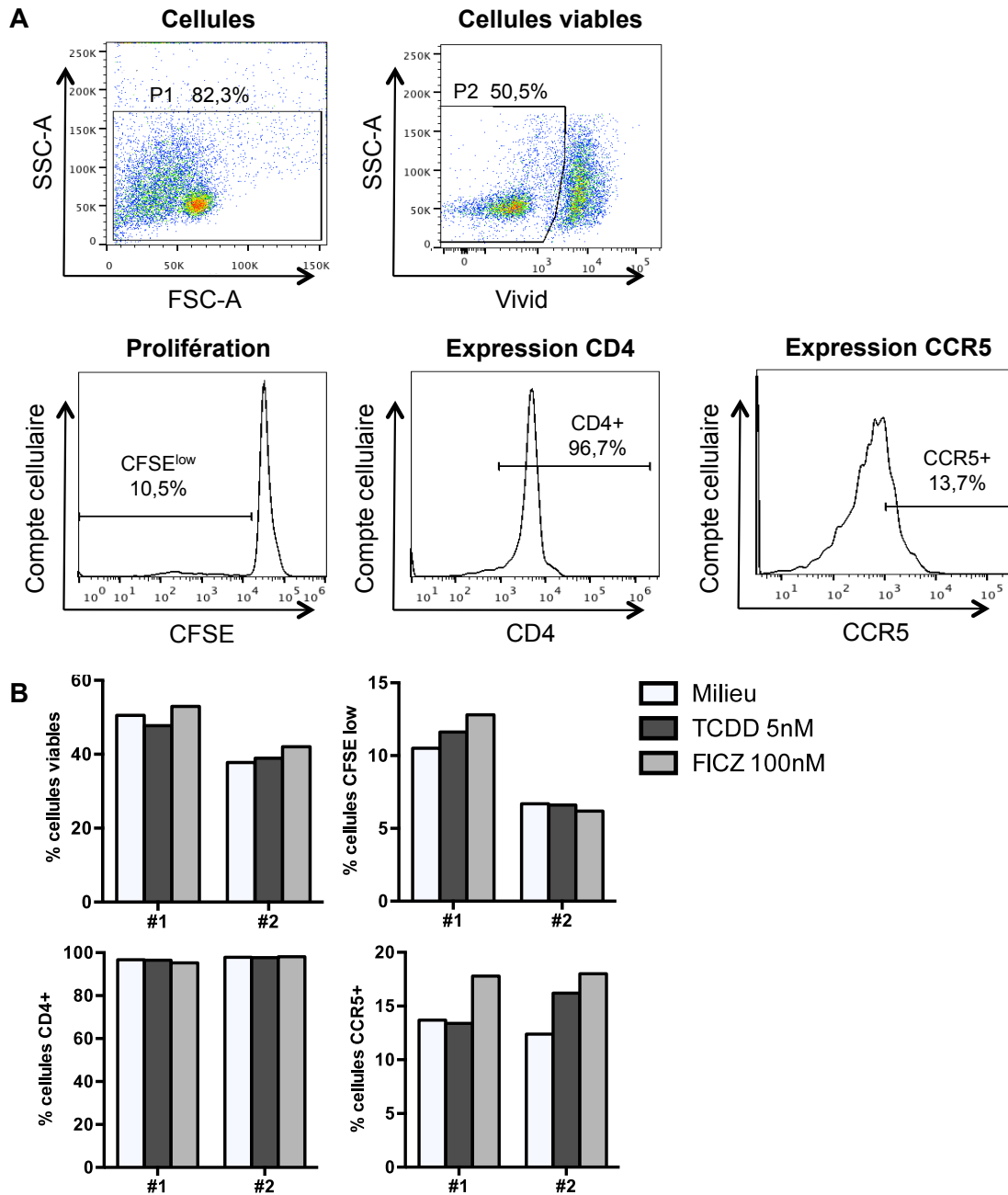
## Figures – Section 4.5



**Figure 21. Effet de l'activation d'AhR sur la susceptibilité à la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4+ mémoires.** Les cellules T CD4+ mémoires ont été isolées par sélection négative à l'aide de billes magnétiques, puis stimulées 3 jours *via* CD3/CD28. Les cellules ont ensuite été exposées au HIV (NL4.3BAL, 13ng de protéine p24/10<sup>6</sup> cellules) durant 3 heures à 37°C avant d'être mises en culture en présence d'IL-2 (5 ng/ml) et de TCDD (5 nM) ou de FICZ (100 nM). La réplication du VIH est mesurée par ELISA de la protéine p24 dans les surnageants de culture récupérés à jour 3, 6, 9 et 13 post-infection. Les résultats sont représentatifs de résultats obtenus avec des cellules de deux donneurs différents.



**Figure 22. Effet de l'inhibition d'AhR par ARN interférence sur la réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4+ mémoires.** Les cellules T CD4+ mémoires isolées par sélection négative en utilisant des billes magnétiques ont été stimulées via CD3/CD28 durant 24h avant d'être nucléofectées avec un ARN interférant (ARNi) dirigé contre AhR (siAhR) ou un ARNi non spécifique (siNT) (Dharmacon) en utilisant le dispositif Nucleofector II (Lonza). Les cellules nucléofectées ont ensuite été cultivées en présence d'IL-2 (5ng/ml) durant 48h avant d'être exposées au VIH durant 3h à 37°C. Après lavage, les cellules ont été remises en culture (IL-2, 5ng/ml). **A.** Des cellules ont été recueillies 48h après nucléofection et l'ARN total a été extrait pour mesurer l'efficacité de l'interférence ARN par RT-PCR en temps réel. **B.** En parallèle, des cellules ont été lysées et la concentration des lysats en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford pour réaliser un immunobuvardage sur gel d'acrylamide. Après transfert sur membranes PVDF, celles-ci ont été exposées à un Acs anti-AhR. La révélation est faite par dosage de la chimioluminescence (ECL Plus, GE Healthcare) sur film photographique. L'expression de la β-actine est utilisée comme contrôle afin de calculer l'intensité relative à l'aide du logiciel GelEval v1.35, tel qu'indiqué sous les bandes. **C-D.** La réplication du VIH aux jours 3, 7 et 10 post-infection a été mesurée par ELISA de détection de la protéine p24 du VIH dans les surnageants. Les cellules ont été infectées avec un virus à tropisme R5 (NL4.3BAL) à 100ng de protéine p24/10<sup>6</sup> cellules. Représentés sont les niveaux (C) absolus (C) ou relatifs (D) de protéine p24 du VIH dans les cellules transfectées avec les ARN interférants contre AhR *versus* ARN contrôle. Les résultats sont représentatifs d'expériences réalisés sur les cellules de 3 donneurs différents (A-B) et sur un donneur (C-D). Les résultats pour cette figure ont été générés par Patricia Monteiro.



**Figure 23. Effet du TCDD et du FICZ sur la viabilité, la prolifération polyclonale et l'expression des récepteurs CD4 et CCR5.** Les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires isolées par sélection négative à l'aide billes magnétiques ont été chargées en CFSE (0.5  $\mu$ M) et stimulées via CD3/CD28 durant 3 jours. Les cellules ont ensuite été mises en culture (IL-2, 5ng/ml) en présence ou en absence de TCDD (5nM) ou de FICZ (100nM) durant 2 jours, puis marquées avec des Acs anti-CD4 et anti-CCR5 ainsi qu'avec le colorant de viabilité vivid avant d'être analysées par cytométrie en flux (cytomètre BD LSRII). **A.** Les cellules viables (vivid négatives, P2) sont d'abord sélectionnées, puis les pourcentages de prolifération (CFSE<sup>low</sup>) et d'expression des molécules CD4 et CCR5 sont déterminés. **B.** Résultats de viabilité, prolifération et expression des molécules CD4 et CCR5 des cellules cultivées en présence de TCDD ou de FICZ relativement aux niveaux correspondants des cellules d'un même donneur cultivées en absence des ligands d'Ahr, n=2.

## 5. DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

*In vivo*, le VIH n'infecte qu'une petite fraction des cellules T CD4<sup>+</sup> (74), qui se divisent ainsi en plusieurs sous-populations à permissivité distincte à l'infection (227). Pour sa réplication, le VIH doit exploiter plusieurs fonctions de la cellule hôte dont le transcriptome influence donc fortement le cycle viral. L'identification et la compréhension du rôle des facteurs cellulaires influençant la permissivité au VIH sont ainsi primordiales afin de développer des stratégies de lutttes contre l'infection. Certains facteurs de permissivité (e.g. NF- $\kappa$ B, TREX1) ou de restriction (e.g. APOBEC3G, TRIM5 $\alpha$ ) de l'infection ont déjà été identifiés (sous-sections 1.10), mais ne suffisent pas à expliquer la permissivité différentielle de certains type cellulaires et de nombreux facteurs cellulaires pouvant influencer la réplication du virus restent sans doute encore à identifier.

### 5.1 Sommaire des résultats

Ce projet de maîtrise se base sur l'hypothèse selon laquelle les cellules Th1Th17 et Th1 expriment un ensemble de facteurs respectivement de permissivité et de résistance à l'infection par le VIH. Notre projet est ainsi divisé en 4 sections portant sur : (i) l'identification des voies canoniques et des fonctions biologiques différemment régulées dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 par l'analyse du transcriptome du génome entier de ces cellules, (ii) la validation de l'expression différentielle des gènes d'intérêt identifiés par biopuces au niveau des transcrits et des protéines, (iii) la caractérisation du rôle fonctionnel de certains de ces facteurs (i.e., PPAR $\gamma$ , ARTNL) sur la réplication du VIH dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 et (iv) la localisation du niveau auquel ces facteurs interfèrent avec le cycle de réplication du VIH.

Tout d'abord, nous avons confirmé les résultats précédents du laboratoire (227) selon lesquels les cellules Th1Th17 sont très permissives à l'infection *in vitro* par une souche à tropisme R5 du VIH, comparativement aux Th1 qui y sont relativement résistantes. Considérant le rôle crucial des souches à tropisme R5 du VIH dans la transmission naturelle de la maladie (section 1.3), les cellules Th1Th17 pourraient contribuer significativement à la pathogenèse *in vivo*.

En ce qui concerne la première section sur les études par biopuce au niveau du génome entier (section 4.2), nous avons identifié des voies canoniques et des fonctions biologiques différemment régulées dans les cellules à polarisation Th1Th17 *versus* Th1. Nous avons montré



des différences significatives dans l'expression de certaines molécules d'adhésion (e.g. MCAM, CEACAM1, ALCAM, PECAM, CAMD1), de cytokines et de chimiokines (e.g. IL-17A/F, IL-22, IL-26, CCL17, CXCL10, IL-5, IL-4) et de leurs récepteurs (e.g. CCR6, CCR2, CXCR6, CXCR5) impliqués dans l'établissement des réponses immune et inflammatoire, en plus que des gènes liés à la différenciation cellulaire (e.g. RORC, RORA, PPAR $\gamma$ , RUNX1, GATA3), la prolifération (e.g. LST1, CTBP2, NKEK2) et l'apoptose (e.g. FASLG, PTEN, CASP4, MAP3K4, BCL2L14, DAPK1). Nos analyses de ces profils d'expression suggèrent que les cellules à polarisation Th1Th17 comparées aux cellules Th1 sont dans un état métabolique actif et sont plus susceptibles à l'activation cellulaire et l'apoptose et qu'elles sont ainsi plus susceptibles de contribuer à la pathogénèse associée au VIH.

Nous avons par la suite sélectionné certains gènes d'intérêt identifiés par biopuce pour une validation de leur expression différentielle et montré l'expression préférentielle des ARNm des gènes CXCR6, PPAR $\gamma$ , ARNTL, CTSH, PTPN13 et MAP3K4 dans les cellules Th1Th17 et inversement l'expression préférentielle de SERPINB6 et PTK2 dans les cellules Th1. L'expression de PPAR $\gamma$  a aussi été confirmée au niveau protéique, tandis qu'ARNTL montre une tendance à être plus exprimé par les cellules Th1Th17 malgré une variabilité entre les donneurs.

Dans un second temps, nous avons étudié le rôle de PPAR $\gamma$  dans la réplication du VIH. En utilisant la rosiglitazone (RGZ), un ligand exogène de la voie PPAR $\gamma$  notamment utilisé en clinique pour le traitement du diabète de type 2 (414) et de la lipodystrophie (415), nous avons montré que l'activation de la voie de signalisation de PPAR $\gamma$  inhibe de façon significative la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> mémoires et dans les cellules à profil Th1Th17 probablement en interférant avec le cycle de réplication virale à un niveau post-intégration. Nous avons aussi montré que dans notre contexte expérimental la RGZ n'influence pas directement la viabilité et la prolifération cellulaire, ni l'expression du récepteur CD4 et du corécepteur du VIH CCR5. Par contre, nos résultats montrent que le traitement des cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires avec la RGZ diminue la production d'IL-17 et d'IFN- $\gamma$  en plus d'inhiber la formation d'agrégats cellulaires, signes d'une diminution de l'état d'activation cellulaire.

Finalement, afin d'étudier le rôle possible d'ARNTL dans l'infection par le VIH, nous nous sommes intéressés au récepteur AhR dont l'expression serait influencée par ARNTL (416-418) et dont l'activation est connue pour favoriser la différenciation vers le profil Th17 (406). Ainsi, nous avons observé les effets de l'activation de la voie AhR par le TCDD ou le FICZ, ligands exogènes (332, 333), sur la réplication virale. Nos résultats démontrent que l'activation d'AhR augmente la réplication du VIH dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires et que l'inhibition de l'expression d'AhR résulte aussi en une augmentation de la réplication du VIH, ce qui suggère des rôles distincts d'AhR dans la régulation de la permissivité virale des cellules selon sa localisation cytoplasmique ou nucléaire. L'activation de la voie AhR par les ligands aux concentrations choisies n'affecte pas la viabilité et la prolifération cellulaire, ni l'expression du récepteur CD4, mais semble favoriser l'expression du corécepteur du VIH CCR5.

## **5.2 Analyse du transcriptome des lymphocytes Th1Th17 *versus* Th1**

Ce projet de recherche représente la toute première caractérisation de l'expression génique au niveau du génome entier comparant des sous-populations de cellules T CD4<sup>+</sup> permissives (Th1Th17) *versus* résistantes (Th1) à l'infection par le VIH. Malgré une très grande similarité de point de vue transcriptionnel (98,7% des gènes détectés sans différences significatives), nous avons identifié 780 transcrits différemment exprimés ( $p < 0.05$ ), parmi lesquels 265 et 235 gènes avec un facteur de changement  $> 1.3$  ou  $< -1.3$  respectivement régulés à la hausse et à la baisse dans les cellules Th1Th17 *versus* les cellules Th1.

Dans un premier temps, plusieurs gènes identifiés comme étant exprimés à la hausse dans les cellules Th1Th17 sont des marqueurs connus des cellules à polarisation Th17 (section 1.9.4), ce qui représente une confirmation initiale de nos résultats. En effet, les cellules Th1Th17 expriment de plus hauts niveaux d'ARNm correspondants aux cytokines du profil Th17, soit l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22 et le CCL20. Les cellules Th1Th17 expriment aussi préférentiellement les transcrits du facteur de transcription ROR $\gamma$ t nécessaire à la différenciation vers le profil Th17 et du récepteur de chimiokines CCR6, utilisé comme marqueur des cellules Th1Th17 et Th17 dans notre stratégie d'isolation par cytométrie en flux. Notre laboratoire a aussi précédemment identifié l'intégrine  $\beta$ 7 (molécule liée au recrutement des cellules dans le tractus gastro-intestinal) et le récepteur de chimiokines CCR7 (impliqué dans la migration vers les organes lymphoïdes) comme étant exprimés à de plus hauts niveaux

par les cellules Th17 et Th1Th17 (227). À l'aide des biopuces, nous avons détecté l'expression des ARNm de ces deux molécules par nos cellules, bien que leurs niveaux d'expression n'apparaissent toutefois pas dans nos résultats significativement différents.

Dans un deuxième temps, les analyses des données obtenues par biopuces à l'aide de *Gene Set Enrichment Analysis*, *Gene Ontology* et *Ingenuity Pathway Analysis* nous ont permis d'identifier des voies de signalisation et des fonctions biologiques pertinentes à l'étude comparative des deux sous-populations lymphocytaires et ont facilité le choix des gènes d'intérêt particulier dans le contexte de l'infection à VIH.

### **5.2.1 Mécanismes de la réplication différentielle du VIH dans les cellules Th1Th17 versus Th1**

Nos résultats indiquent des différences d'expression de gènes jouant un rôle notamment dans la migration transendothéliale, l'inflammation, la différenciation des cellules T, la prolifération, l'apoptose et la protéolyse, ainsi que plus spécifiquement dans la voie de signalisation et de production de l'IL-15, dans la voie d'activation du répresseur transcriptionnel PPAR $\gamma$  et au niveau de gènes liés au régulateur transcriptionnel ARNTL. D'intérêt dans le contexte de l'infection par le VIH, nous avons premièrement observé une plus grande expression par les cellules Th1Th17 du récepteur de chimiokines CXCR6, un co-récepteur mineur du VIH. Son expression peut favoriser l'entrée du virus (419), en plus de promouvoir la dissémination de l'infection (207, 208). Certaines souches de SIV comme SIVmac239 et SIVmac316 utilisent CXCR6 comme corécepteur majeur pour l'entrée (420, 421). L'utilisation de CXCR6 comme corécepteur du VIH chez les sujets infectés n'est pas documentée, mais la coexpression du CXCR6 et du CCR5 sur des cellules T activées (204) témoigne de la forte susceptibilité de ces cellules à l'infection *in vivo*. L'unique ligand de CXCR6 découvert à présent est la chimiokine CXCL16, qui représente la deuxième chimiokine connue à être exprimée sous forme liée à la membrane (209, 422). CXCL16 est exprimé spécifiquement sur les monocytes CD16 $^{+}$  (211), une sous-population monocyttaire avec un profil pro-inflammatoire, dont la fréquence est augmentée chez les sujets infectés par le VIH (212) et ayant l'unique capacité au sein des monocytes de promouvoir la réplication virale dans les cellules T CD4 $^{+}$  (207, 208). De plus, CXCL16 est exprimé à la surface des DCs (210), qui ont une extraordinaire capacité à capturer et transmettre le VIH aux cellules T CD4 $^{+}$  après

formation de la synapse immunologique (section 1.8.1). Finalement, l'expression de CXCR6 sur les cellules Th1Th17 peut faciliter la localisation des cellules aux plaques de Peyer, qui représentent des sites anatomiques de forte réplication virale *in vivo* (209). Dans ce contexte, l'interaction CXCR6-CXCL16 pourrait contribuer de façon significative à l'infection des cellules Th1Th17 *in vivo*. En accord avec cette possibilité, le polymorphisme CXCR6 est associé à une progression lente de la maladie chez les personnes infectées par le VIH (205, 206). Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques interférant avec la voie CXCR6-CXCL16 pourraient limiter la dissémination et la réplication du virus *in vivo*. Des expériences sont en cours au laboratoire pour étudier le rôle de CXCR6 dans la formation de la synapse immunologique entre les cellules Th1Th17 et les DCs exprimant CXCL16 et dans la transmission de cellule à cellule du VIH.

Les cellules Th1Th17 apparaissent ensuite plus susceptibles à l'activation cellulaire comme le montre entre autres leur expression préférentielle d'ARNm de la molécule de costimulation CD28 et du CD40LG. Leur forte expression d'ARNm de l'IL-15 pourrait aussi faciliter l'activation cellulaire en renforçant considérablement la réponse des lymphocytes T à un engagement sous-optimal du TCR (423). L'expression des gènes importants pour les signaux de transduction en aval du TCR indiquent aussi une plus grande susceptibilité des cellules Th1Th17 à l'activation cellulaire et un potentiel de contribution à l'inflammation plus important. Par exemple, les cellules Th1Th17 expriment préférentiellement MAPKAPK2/MK2, une kinase impliquée dans la production de TNF- $\alpha$  et IL-6 (389). À l'opposé, les cellules Th1 expriment préférentiellement GRK5 et CNKSR2/KSR2, deux molécules pouvant inhiber l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (392, 393)). Or, l'état d'activation du système immunitaire favorise l'infection et la réplication du VIH (63). De façon intéressante, des criblages à grande échelle par ARN interférence réalisés en 2008 ont identifié la voie NF- $\kappa$ B comme un facteur de dépendance du VIH (HDF, *HIV-dependency factor*) (260, 263). Il a aussi été montré que les promoteurs LTR du VIH possèdent des sites de liaison NF- $\kappa$ B importants pour la transcription du virus (272) (sections 1.10 et 1.10.1). Il serait ainsi d'intérêt de vérifier si l'expression des kinases GRK5 et CNKSR2 peut limiter la translocation de NF- $\kappa$ B dans les cellules à profil Th1 et donc expliquer en partie la moins grande permissivité de ces cellules à l'infection par le VIH.

La fonction immunologique des cellules T CD4<sup>+</sup> est strictement dépendante de leur localisation anatomique (424) et celle-ci est principalement influencée par l'expression et l'interaction des récepteurs de chimiokines et des molécules d'adhésion avec leurs ligands. L'expression préférentielle du récepteur CCR6 par les cellules Th1Th17 favorise leur localisation aux plaques de Peyer (226), lieu de forte réplication virale. L'expression de CCR6, tout comme l'expression préférentielle de CCR2, facilite aussi la migration vers le cerveau (343, 425) où les cellules peuvent entre autres contribuer à la formation du réservoir viral. Le ligand de CCR2, CCL2 (aussi appelé MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*), est d'ailleurs surexprimé dans le cerveau des sujets infectés par le VIH (426) et son expression peut être induite par la protéine virale Tat (427). Pour ce qui est du ligand de CCR6, CCL20 (aussi appelé MIP-3 $\alpha$ , *macrophage inflammatory protein-3 alpha*), il est surexprimé dans le cerveau des patients atteints de sclérose en plaques (428) et persiste à de hauts niveaux dans le sang des personnes infectées par le VIH (429).

Il est intéressant aussi de noter l'expression préférentielle des molécules d'adhésion MCAM et CEACAM1 par les cellules Th1Th17. MCAM pourrait faciliter l'entrée des cellules Th1Th17 au niveau du système nerveux central (340, 341) et ainsi participer à la dissémination du virus au cerveau, favorisant l'établissement de la démence liée au SIDA. MCAM est également impliquée dans la sclérose en plaques (340, 341), une maladie caractérisée par la localisation préférentielle des cellules Th1Th17 au niveau du cerveau (430). Quant à CEACAM1, elle est reconnue pour son rôle dans l'entrée de *Neisseria gonorrhoeae* dans les cellules T CD4<sup>+</sup> (431), une infection associée à une plus forte susceptibilité au VIH et à une augmentation de la transmission du VIH dans les cas de coinfections (432). À l'inverse, la molécule d'adhésion ALCAM est préférentiellement exprimée par les cellules à profil Th1 et permet elle aussi aux cellules d'être recrutées au cerveau. Dans les cas d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), le blocage d'ALCAM permet de diminuer et de retarder le développement de la maladie en inhibant la transmigration des cellules T CD4<sup>+</sup> à travers la barrière hématoencéphalique (347). Même si elles sont relativement résistantes à l'infection par le VIH, les cellules à profil Th1 peuvent donc contribuer à la neuropathogénèse associée au VIH en produisant des cytokines pro-inflammatoires au niveau du système nerveux central. L'expression différentielle au niveau des protéines de ces récepteurs de chimiokines et molécules d'adhésion est en cours de validation dans notre laboratoire afin de confirmer les

potentiels migratoires distincts des deux sous-populations lymphocytaires Th1Th17 et Th1 au niveau du tractus gastro-intestinal et du cerveau.

D'un autre côté, les cellules à profil Th1Th17 semblent plus susceptibles à l'apoptose via leur expression préférentielle de FASLG, PTEN, CASP4, MAP3K4 et PTPN13, gènes tous impliqués dans l'induction de la mort cellulaire (sections 4.2.2.5 et 4.2.2.6). Ceci, en plus de la susceptibilité accrue au virus, pourrait contribuer à l'épuisement et à la déplétion plus rapide des cellules Th1Th17 observés par notre groupe lors de l'infection par le VIH (227). L'expression de PTEN est d'ailleurs associée aux effets neurotoxiques induits par le VIH au niveau des neurones (371), mais est aussi impliquée dans la mort des cellules T CD4<sup>+</sup> induite par la protéine virale Tat (372).

Finalement, les données obtenues par biopuce et les études subséquentes (sections 4.4 et 4.5) ont aussi permis d'identifier PPAR $\gamma$  comme un régulateur négatif de la réplication du VIH préférentiellement exprimé dans les cellules à profil Th1Th17 (sous-sections 5.3) et nous ont permis d'établir un modèle selon lequel l'expression d'ARNTL dans les cellules Th1Th17 pourrait favoriser la régulation de la réplication du VIH *via* une interaction potentielle avec le récepteur AhR (sous-sections 5.4).

Ainsi, nous avons identifié des différences dans la régulation de diverses voies et fonctions biologiques permettant en partie d'expliquer la susceptibilité différentielle à l'infection par le VIH des cellules à polarisation Th1Th17 *versus* Th1 et de clarifier leur contribution respective à la pathogénèse associée au VIH. Ces études suggèrent diverses cibles pour des stratégies thérapeutiques visant à interférer avec la réplication du VIH dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> primaires.

### **5.3 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )**

PPAR $\gamma$  est un récepteur nucléaire de type 2 qui agit comme un facteur de transcription afin de réguler le métabolisme du glucose, la différenciation des adipocytes et le stockage des acides gras. Un des ligands naturels de PPAR $\gamma$  est la prostaglandine J2, mais des ligands synthétiques de la famille des thiazolidinédiones (TZD, aussi appelés glitazones) permettent aussi l'activation de la voie de signalisation PPAR $\gamma$  (e.g. rosiglitazone, pioglitazone) (433). Suite à

l'interaction avec l'un ou l'autre de ses ligands, PPAR $\gamma$  est transloqué vers le noyau où il forme un hétérodimère avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR). Ce complexe peut lier les régions PPRE (*PPAR response element*) sur l'ADN pour réguler la transcription de plusieurs gènes (434). Les TZD sont utilisées pour traiter les patients atteints du diabète de type 2 afin d'augmenter leur sensibilité à l'insuline (435) et sont parfois également employées pour contrer les lipodystrophies associées aux traitements antirétroviraux dirigés contre le VIH (436).

L'activation de PPAR $\gamma$  est aussi impliquée dans la régulation négative de la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> vers le profil Th17 en empêchant le retrait du corépresseur SMRT du promoteur de ROR $\gamma$ t (362). De plus, il a été démontré que dans les macrophages PPAR $\gamma$  peut moduler l'activité transcriptionnelle du facteur NF- $\kappa$ B de manière récepteur-dépendante. Ceci conduit à une régulation à la baisse de l'activité du promoteur LTR du VIH-1 et donc à une suppression de la réplication virale (404). Un effet similaire a été observé dans des lignées cellulaires associées à l'intestin dont Caco-2 (cellules épithéliales du colon) et HT29 (cellules de carcinome du colon) (437). Cette inhibition de l'activité de NF- $\kappa$ B par PPAR $\gamma$  explique sans doute en partie les observations selon lesquelles l'activation de la voie PPAR $\gamma$  permet aussi d'inhiber la réponse pro-inflammatoire des macrophages induite par la présence de LPS ou d'IFN- $\gamma$  (359) et permet d'inhiber la production de TNF- $\alpha$  dans la lignée monocyttaire U1 et les macrophages alvéolaires chroniquement infectés par le VIH (438).

D'un autre côté, il a été démontré que PPAR $\gamma$  peut interagir avec l'histone déacétylase 3 (HDAC3), une enzyme qui altère la structure de l'ADN pour en réduire l'accès aux facteurs de transcription. Lors de son interaction avec ses ligands, PPAR $\gamma$  change de conformation, ce qui y expose un site de sumoylation (434). La sumoylation est une modification post-traductionnelle par laquelle une ou plusieurs petites protéines SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) sont liées de façon covalente à une autre protéine. Ce phénomène est entre autres impliqué dans la régulation de la transcription et le transport vers le noyau (439). Suite à sa sumoylation, PPAR $\gamma$  est ciblé vers le complexe NCoR-HDAC3 (NCoR, *nuclear receptor co-repressor*) et empêche le complexe de quitter le promoteur auquel il est associé sur l'ADN, empêchant par le fait même l'expression du gène correspondant. Dans les macrophages, ce mécanisme d'action de la répression génique induite par l'activation de PPAR $\gamma$  permet l'inhibition des promoteurs de gènes liés à l'inflammation (434). Il est à noter que HDAC3 est connue pour réprimer l'activité

des LTR du VIH et ainsi induire la latence de l'infection (section 1.5.2) (86). Il n'a toutefois pas été démontré si l'interaction de PPAR $\gamma$  avec HDAC3 peut aussi se produire au niveau des LTR et ainsi inhiber la réplication du VIH.

Finalement, l'activation de la voie PPAR $\gamma$  entraîne une cascade transcriptionnelle médiée par LXR (*liver X receptor*) conduisant à l'expression de ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter 1*). ABCA1 est aussi connue sous le nom CERP (*cholesterol efflux regulatory protein*) étant donné son rôle dans le contrôle de l'efflux de cholestérol (440). L'expression d'ABCA1 induite par l'activation de PPAR $\gamma$  résulte en une diminution du taux de cholestérol dans les DCs. Le cholestérol étant important pour la capture des particules virales du VIH par les DCs, il en résulte une diminution de la trans-infection des cellules T CD4<sup>+</sup> par les DCs (441).

### **5.3.1 PPAR $\gamma$ est différemment exprimé dans les cellules Th1Th17 versus Th1**

Les données recueillies par les études de biopuces ont montré que l'ARNm de PPAR $\gamma$  est plus exprimé dans les cellules à profil Th1Th17 que dans les cellules à profil Th1 (Tableau 6A, FC 2.04, valeur  $p = 0.0185$ ) et les analyses par *Gene ontology* (section 4.2.2) et par *Ingenuity Pathway Analysis* (section 4.2.3) ont toutes deux fait ressortir cette expression différentielle. Nous avons confirmé ces résultats au niveau des ARNm par RT-PCR quantitative en temps réel et avons démontré l'expression préférentielle de PPAR $\gamma$  par les cellules Th1Th17 au niveau des protéines par immunobuvardage et microscopie à fluorescence (Fig. 14 et 15). Il est intéressant de constater que les cellules Th1Th17 expriment donc plus fortement cette molécule dont l'activation permet l'inhibition de l'expression du facteur de transcription RORC qui est pourtant nécessaire à la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> vers les profils Th17 et Th1Th17 (244). Ces deux types cellulaires étant hautement permissifs à l'infection par le VIH (227), l'activation de PPAR $\gamma$  pourrait permettre de diminuer la réplication virale en diminuant la proportion de cellules à haute permissivité.

### **5.3.2 L'activation de PPAR $\gamma$ inhibe la réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires**

Nos résultats démontrent que l'activation de la voie PPAR $\gamma$  par la RGZ inhibe la réplication du VIH dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires totales et dans les cellules à polarisation



Th1Th17 et suggèrent que cette voie inhibe l'infection par le VIH principalement à des niveaux post-intégration (Fig. 17). L'augmentation de la réplication du VIH observée dans les cellules transfectées avec un ARNi dirigé contre PPAR $\gamma$  confirme un rôle de régulateur négatif de la réplication du virus pour PPAR $\gamma$  tout en impliquant un certain niveau d'activation basale de la voie (Fig. 18). Cet effet n'est pas dû à un changement dans la viabilité ou la prolifération cellulaire, ni dans une altération des niveaux d'expression du récepteur CD4 ou du corécepteur CCR5 (Fig. 19) qui pourraient influencer l'étape de l'entrée virale dans les cellules cibles.

Nous avons utilisé un virus à tropisme R5 (NL4.3BAL) de type sauvage pour toutes nos expériences d'infection, à l'exception des infections réalisées sur les cellules Th1Th17 et Th1 triées, expériences pour lesquelles nous avons plutôt employé un virus NL4.3BAL n'exprimant pas la protéine Nef. Cette protéine étant très importante pour la virulence du virus (section 1.2.2), son absence permet de diminuer la mortalité cellulaire associée à l'infection (442) afin d'obtenir une cinétique de la réplication virale jusqu'à 12 jours post-infection sans causer de trop hauts niveaux de mortalité chez les cellules Th1Th17 qui sont très permissives à l'infection et la réplication du virus. Or, il a été démontré en 2004 par Otake *et al.* que l'expression de la protéine virale Nef au noyau cellulaire permet de diminuer l'expression de PPAR $\gamma$  (443). Des expériences préliminaires de la même équipe suggèrent aussi que Nef pourrait s'associer avec une forte affinité à PPAR $\gamma$ . L'interaction de Nef avec PPAR $\gamma$  est également impliquée dans l'inhibition de l'expression de STAT5 (*signal transducer and activator of transcription 5*), une molécule importante dans les étapes précoces de l'hématopoïèse (444), ce qui conduit à la dérégulation de l'hématopoïèse et participe à l'immunodéficience induite par le VIH.

Il est ainsi intéressant de constater que nous observons une inhibition significative de la réplication virale lors de l'activation de PPAR $\gamma$  en utilisant des virions avec ou sans la protéine Nef (Figure 17). D'un autre côté, nous pouvons suggérer que l'activation de la voie PPAR $\gamma$  est plus forte en absence de Nef, ce qui pourrait expliquer en partie pourquoi les souches Nef<sup>+</sup> se répliquent mieux comparativement aux souches Nef<sup>-</sup>. Il serait donc intéressant de réaliser en parallèle sur les cellules de mêmes donneurs des expériences d'infection avec une souche virale avec ou sans Nef afin de comparer les niveaux d'inhibition de la réplication virale par la RGZ en présence ou en absence de la protéine virale Nef.

### 5.3.3 Effet anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$

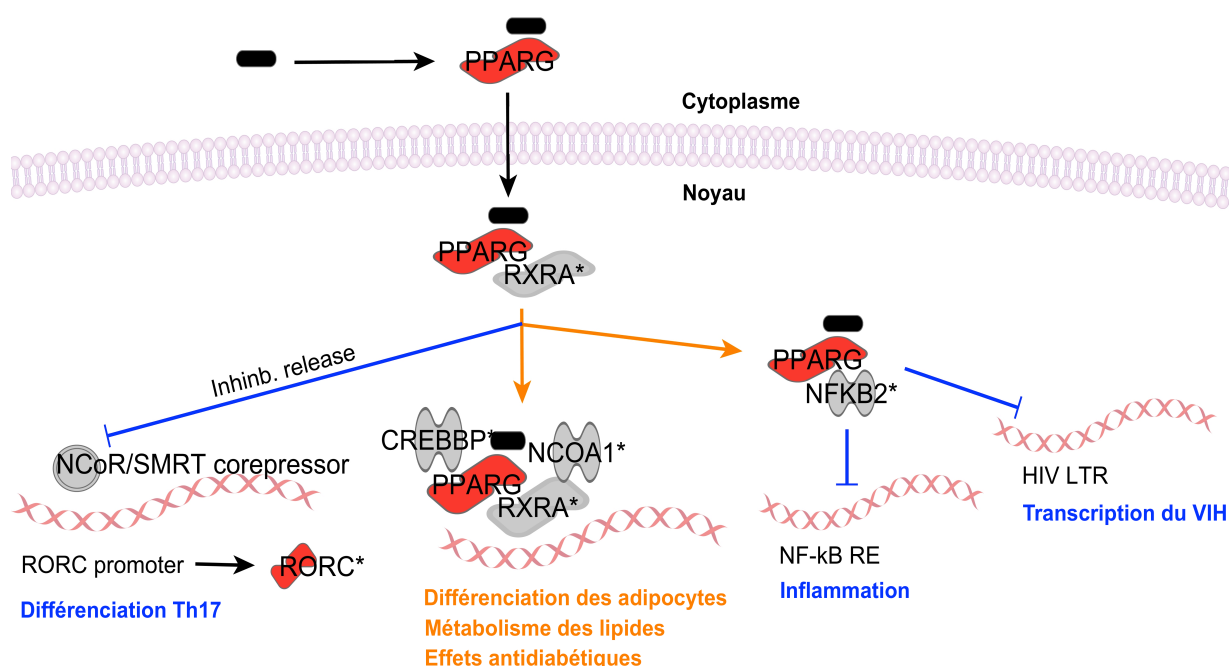
Nous avons ensuite montré que l'activation de PPAR $\gamma$  par la RGZ dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires inhibe la production d'IFN- $\gamma$ , une cytokine pro-inflammatoire. Ceci peut être dû à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B (434) et à l'interaction de PPAR $\gamma$  avec HDAC3 au niveau des promoteurs des gènes liés à l'inflammation (404). Ces résultats contrastent avec les résultats publiés par Klotz *et al.* (362) chez un modèle de souris avec l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE). Toutefois, en accord avec Klotz *et al.*, nos résultats démontrent une régulation négative de la production d'IL-17 par la RGZ (Fig. 20). La diminution de l'expression de l'IL-17 peut aussi être liée à l'inhibition de l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t nécessaire à la différenciation vers les profils Th17 et Th1Th17 (362). L'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires par PPAR $\gamma$  devrait avoir un effet bénéfique dans le contexte de l'infection par le VIH en diminuant l'état d'activation du système immunitaire et par conséquent aussi la permissivité des cellules à l'infection et la dissémination du virus (63, 445).

Nous avons de plus observé que le traitement des cellules par la RGZ inhibe la formation des agrégats cellulaires (signe d'activation cellulaire) en culture *in vitro* (Fig. 16), ce qui pourrait diminuer la transmission du VIH de cellule T à cellule T. Ce phénomène peut également avoir des effets dans la transmission virale *in vivo*, notamment via la diminution de l'expression de l'intégrine ICAM-1 induite par l'activation de PPAR $\gamma$  (409), cette intégrine étant impliquée dans la formation des agrégats de cellules T-T (410).

### 5.3.4 PPAR $\gamma$ est un régulateur négatif de la réplication du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Nos résultats indiquent que l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  par la RGZ inhibe de façon significative et même fortement ( $\geq 60\%$ ) la réplication du VIH dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires, ainsi que dans les cellules à profil Th1Th17. Il s'agit de la première démonstration du rôle de PPAR $\gamma$  comme régulateur négatif de la réplication du VIH dans ces cellules. Nous suggérons un modèle impliquant principalement trois mécanismes au niveau des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Figure 24). Premièrement, l'activation de PPAR $\gamma$  inhibe l'expression du facteur de transcription ROR $\gamma$ t et donc la différenciation des cellules T CD4<sup>+</sup> vers les profils Th17 et Th1Th17 (362), ce qui contribue à diminuer la proportion de cellules hautement

permissives à l'infection (227). Ensuite, la voie  $\text{PPAR}\gamma$  inhibe l'activité transcriptionnelle de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ , ce qui diminue la transcription au niveau des séquences promoteurs LTR du VIH (404). Finalement, l'inhibition de l'activité du facteur  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  résulte aussi en une diminution de l'expression de plusieurs gènes liés à l'inflammation et permet donc une baisse du niveau d'activation cellulaire et de la permissivité au VIH (63). L'interaction de  $\text{PPAR}\gamma$  avec le complexe  $\text{NCoR-HDAC3}$  au niveau des promoteurs des gènes contribue également à l'inhibition de l'inflammation (434).  $\text{PPAR}\gamma$  étant préférentiellement exprimé dans les cellules T  $\text{CD4}^+$  hautement permissives à l'infection, il s'agit d'une cible thérapeutique avec un fort potentiel dans le traitement de la pathogénèse associée au VIH.



**Figure 24. Modèle proposé pour l'inhibition de la réplication du VIH par l'activation de  $\text{PPAR}\gamma$ .** L'activation de  $\text{PPAR}\gamma$  est impliquée dans la régulation négative de la différenciation vers le profil Th17, le métabolisme des lipides, l'inhibition de diverses réponses pro-inflammatoires, ainsi que l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des LTR du VIH (362, 404, 437). Figure générée à l'aide du logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA, États-Unis).

Apparue sur le marché en 2002 sous le nom d'Avandia, la rosiglitazone a déjà été utilisée en clinique chez des patients atteints de diabète de type 2 pour augmenter leur sensibilité à

l'insuline (414), ainsi que chez des patients infectés par le VIH afin de contrôler les phénomènes de lypodystrophie associés à la thérapie antirétrovirale (415). Toutefois, en 2007, une méta-analyse de 42 essais cliniques de phase 2, 3 ou 4 publiée dans le *New England Journal of Medicine* a rapporté que le traitement par la RGZ durant 24 semaines ou plus augmente significativement le risque d'infarctus du myocarde (446). Depuis, son usage clinique est restreint et tend à être remplacé par d'autres molécules de la famille des thiazolidinédiones (TZD), dont la pioglitazone qui semble induire moins d'effets secondaires. De nouvelles glitazones sont aussi en cours de développement ou d'essais cliniques, telle la rivoglitazone (essai clinique de phase 2 en 2011) (447). Un ligand naturel de PPAR $\gamma$  est la prostaglandine J2 qui permet la différenciation des adipocytes via l'activation de la voie PPAR $\gamma$  (448) et qui résulte aussi en l'inhibition de la réplication du VIH dans la lignée cellulaire Caco-2 (cellules épithéliales du colon) (437). Étant donné l'inhibition de la réplication du VIH observée dans les macrophages (404) et dans les cellules T CD4<sup>+</sup> mémoires, nous soulignons l'importance d'un essai clinique pour tester l'effets des agonistes de PPAR $\gamma$  administrés en primo infection avec la thérapie antirétrovirale afin de déterminer la taille du réservoir viral avec et sans agoniste de PPAR $\gamma$ , avant et après le traitement.

#### **5.4 Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (ARNTL)**

Le translocateur nucléaire *aryl hydrocarbone-like* (ARNTL), aussi connu sous les noms MOP3 et Bmal1, est similaire en taille et en structure à AhR et ARNT (449). ARNTL peut interagir avec la protéine Clock pour former un hétérodimère agissant comme un facteur de transcription en liant des séquences E-box sur l'ADN. Ceci permet d'induire l'expression d'autres gènes de la famille clock importants dans le maintien du rythme circadien (e.g. gènes *Per* et *Tim*) pour contrôler les rythmes dans l'acétylation des histones H3 (364, 450). En 2007, il a été démontré que chez la souris l'expression des gènes de la famille clock altère les réponses liées à la voie de signalisation AhR (*aryl hydrocarbon receptor*). En effet, les effets induits par le ligand exogène TCDD (2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine) via la voie AhR varient au fil du temps et sont significativement plus importants au cours de la nuit (416), ce qui correspond au moment où l'expression de l'ARNm d'ARNTL est à son plus haut niveau (417). Les études de Richardson *et al.* ont aussi montré que les niveaux d'expression d'AhR varient selon un cycle journalier (418) et il semble que l'activation de la voie AhR perturbe l'activité ARNTL-Clock, ce qui peut déréguler le rythme circadien (451). Finalement, il a été montré

qu'ARNTL peut directement interagir avec AhR *in vitro* (449). L'identification par nos études de biopuce d'ARNTL comme un gène étant préférentiellement exprimé dans les cellules à polarisation Th1Th17 *versus* Th1 (sections 4.2.2, 4.2.3 et 4.3) nous a ainsi conduits à l'étude des effets potentiels de l'activation d'AhR sur la réplication du VIH.

#### 5.4.1 Aryl hydrocarbon receptor (AhR)

Le récepteur aryl hydrocarbure (AhR) est un facteur de transcription membre de la famille hélice-boucle-hélice (bHLH, basic-helix-loop-helix) modulant l'expression de plusieurs gènes principalement associé à la réponse aux polluants environnementaux. Dans sa forme dite inactive, AhR est principalement retrouvé au niveau du cytosol (452) et est lié à des chaperonnes qui vont s'en dissocier en présence des ligands d'AhR, dont font partie entre autres des hydrocarbures aromatiques synthétiques, des dérivés du tryptophane, la dioxine ou encore la prostaglandine G. Cela résulte en la translocation d'AhR au noyau, où il dimérise avec le translocateur nucléaire aryl hydrocarbure (ARNT). L'hétérodimère AhR/ARNT peut lier des séquences spécifiques de l'ADN et induire des changements dans l'expression génique (332).

Parmi ces changements, notons une régulation à la hausse des cytochromes P450 (CYP450) (453). Étant impliqué dans la dégradation des médicaments, il est suggéré qu'une augmentation de CYP450 rende les traitements par antirétroviraux moins efficaces. L'activation d'AhR par ses ligands durant le développement vers un profil Th17 peut aussi augmenter la proportion de cellules Th17 en plus d'augmenter leur production de cytokines, dont l'IL-22 pro-inflammatoire (406, 454). D'un autre côté, AhR peut agir comme une E3 ubiquitine ligase (413) et pourrait donc possiblement aider dans le processus de dégradation protéosomale du VIH (455). En effet, AhR peut faire partie du complexe ubiquitine ligase CUL4B<sup>AhR</sup> connu entre autres pour son implication dans la dégradation des récepteurs des stéroïdes (413). En 2008, Quintana et collègues ont démontré que les effets induits par l'activation d'AhR varient dépendamment du ligand rencontré (456). Les différences dans la structure des divers ligands d'AhR pourraient induire des conformations d'AhR uniques selon le ligand et ainsi influencer l'identité des cofacteurs recrutés et la fonctionnalité d'AhR (457). De plus, en utilisant un modèle chez la drosophile l'équipe de Dr Couso a montré qu'AhR possède un niveau d'activité basal induisant des effets différents de ceux induits par son état dit hyperactif en présence de ses ligands (458). AhR peut aussi s'associer avec RelB, une sous-unité du complexe NF-κB, et ainsi induire la

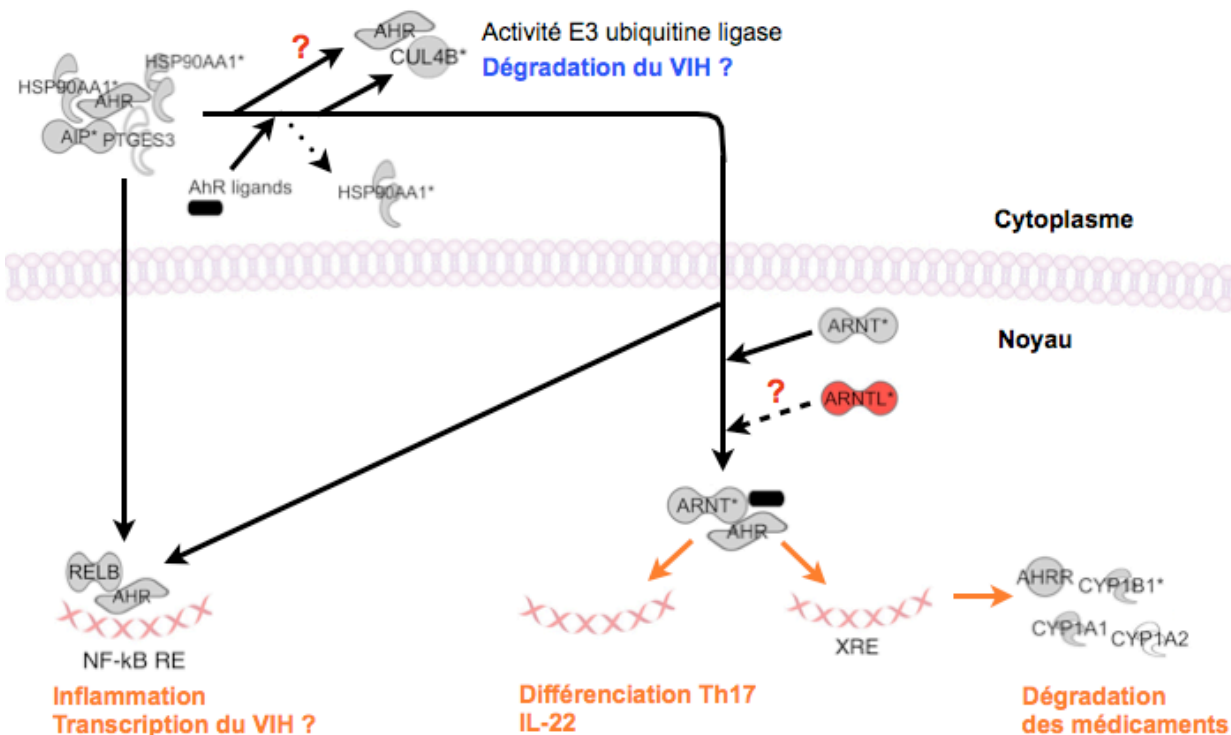
transcription de gènes normalement régulés par NF- $\kappa$ B. Cette activité d'AhR a lieu en absence et en présence de ligand, bien que les ligands d'AhR favorisent sa translocation et donc son interaction avec RelB (459) (Fig. 25). Finalement, AhR semble être exprimé à des niveaux similaires dans les cellules Th1Th17 et Th1, bien que nous ayons noté une grande variabilité entre les donneurs (Fig. supplémentaire 2).

#### **5.4.2 L'activation d'AhR augmente la réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4+ mémoires**

Nos résultats montrent que l'activation d'AhR par les ligands TCDD et FICZ augmente fortement la réplication du VIH dans les cellules T CD4+ mémoires (Fig. 21). Toutefois, l'interférence ARN dirigée contre AhR augmente aussi significativement la réplication du VIH dans ces cellules (Fig. 22). Nous en concluons que l'activation de la voie AhR favorise la réplication du virus, mais que l'expression d'AhR à son niveau d'activation basal est quant à elle bénéfique pour restreindre l'infection. Nous avons aussi montré que les ligands TCDD et FICZ aux concentrations choisies n'altèrent pas la viabilité et la prolifération des cellules, ni l'expression du récepteur CD4 important pour l'entrée du VIH dans les cellules cibles. L'expression du corécepteur CCR5 semble par contre augmenter ( $\leq 31,2\%$  d'augmentation avec FICZ et  $\leq 23,5\%$  avec TCDD), ce qui pourrait favoriser l'entrée des virions (Fig. 23). Cet effet sur l'expression de CCR5 n'est pas surprenant, vu qu'AhR est aussi connu comme un modulateur de la molécule intégrine  $\beta 7$  (460), un marqueur de migration vers l'intestin exprimé par les cellules CCR5+ hautement permissives au VIH (227). Cependant, étant donné l'importance de l'augmentation de la réplication virale en présence des ligands d'AhR (jusqu'à 230% d'augmentation avec TCDD et 109% avec FICZ), d'autres mécanismes sont sans doute impliqués.

Nous suggérons ainsi un modèle du rôle d'AhR dans la régulation de la réplication du VIH basé sur les différents effets reconnus de ce récepteur (Fig. 25). Premièrement, l'activation d'AhR favorise sa translocation nucléaire et induit la transcription de gènes, dont ceux liés aux cytochromes P450 impliqués dans la dégradation des polluants environnementaux et aussi des médicaments (453). Dans le cas d'une personne sous traitement antirétroviral, ceci pourrait conduire à une moins grande efficacité des médicaments et donc favoriser l'infection. Deuxièmement, l'activation d'AhR peut favoriser la différenciation vers le profil Th17, ce qui

implique une augmentation de la proportion de cellules hautement permissives à l'infection (227). L'expression de l'IL-22 induite par AhR pourrait quant à elle jouer un rôle de protection puisque l'IL-22 stimule les cellules épithéliales à produire une variété de molécules antibactériennes et aide à renforcer les barrières mucosales (255, 256). Il est toutefois important de souligner que l'IL-22 est préférentiellement produite par les cellules à profil Th17 (461) et Th1Th17 (Tableau 6A), deux sous-populations hautement permissives au VIH (227) et il y a donc probablement une pénurie en IL-22 lors de l'infection par le VIH. De plus, l'interaction d'AhR avec RelB, augmentée par l'activation d'AhR, permet d'induire des gènes présentant des séquences de liaisons à NF- $\kappa$ B (459) et peut favoriser le développement de la réponse inflammatoire et l'activation cellulaire. Ceci peut entre autres expliquer l'augmentation de l'expression du récepteur de chimiokines CCR5 dont l'expression est connue pour être induite lors de l'activation des cellules T (462). Il est à noter que NF- $\kappa$ B peut induire la transcription du VIH au niveau des séquences promotrices LTR (273) et qu'il n'est pas connu si l'hétérodimère AhR-RelB peut aussi induire cette activité transcriptionnelle. Il est par contre rapporté que l'induction de la voie AhR par l'utilisation du 3-méthylcholanthrène (3-MC), un ligand d'AhR, permet la réactivation de la réplication du VIH dans une lignée de cellules promyélotiques (lignée OM 10.1) infectée de façon latente en induisant l'expression virale induite par les LTR (463). D'un autre côté, il n'est pas connu si l'activité E3 ubiquitine ligase d'AhR (413) pourrait permettre la dégradation de certaines protéines virales et ainsi limiter l'infection. De plus, le rôle différentiel d'AhR selon le ligand avec lequel il interagit (457), ainsi que les effets induits par l'activité basale d'AhR (458) sont méconnus. Par exemple, il est possible que l'activité basale d'AhR permette son inclusion dans un complexe E3 ubiquitine différent de celui induit par les ligands d'AhR et permettant la dégradation de différents substrats. Ainsi, les effets délétères de l'activation d'AhR par ses ligands (notamment le TCDD et le FICZ) dans le contexte de l'infection par le VIH sont nombreux, mais l'implication de l'expression d'AhR dans sa forme non-activée cytoplasmique dans le contrôle de l'infection reste à établir. Le mécanisme par lequel le AhR sous sa forme nucléaire *versus* cytoplasmique interfère avec la réplication virale est en cours d'étude au laboratoire. Finalement, nous suggérons que l'expression préférentielle d'ARNTL dans les cellules à polarisation Th1Th17 *versus* Th1 favorise la réponse du récepteur AhR (416, 417) dans les cellules Th1Th17.



**Figure 25. Modèle proposé du rôle d'AhR et ARNTL dans la régulation de la réplication du VIH-1 dans les cellules T CD4+.** Les ligands d'AhR induisent la translocation nucléaire d'AhR et son hétérodimérisation avec ARNT (332) afin d'induire la transcription des cytochromes (453). L'activation d'AhR peut aussi induire la différenciation vers le profil Th17 (406) et la production d'IL-22 (454). AhR peut interagir avec RelB et induire la transcription de gènes comportant des séquences promotrices pour NF- $\kappa$ B (459). De plus, AhR possède une activité E3 ubiquitine ligase et peut former un complexe important pour la dégradation protéosomale (413). Figure générée à l'aide du logiciel *Ingenuity Pathway Analysis* (Ingenuity Systems Inc, Redwood City, CA, États-Unis).

### 5.5 Conclusions générales et perspectives

Nos études du transcriptome des cellules Th1Th17 hautement permissives à l'infection par le VIH *versus* les cellules Th1 relativement résistantes à l'infection nous ont permis de constater que ces deux sous-populations lymphocytaires diffèrent probablement de point de vue de leur potentiel migratoire (surtout au niveau de l'intestin et du cerveau) et ont différentes susceptibilités à l'activation cellulaire et à l'apoptose. De plus, les cellules Th1Th17 expriment préférentiellement le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  qui agit comme un régulateur négatif de la réplication du VIH dans les cellules T CD4+ mémoires lors de son activation par la



rosiglitazone. Le récepteur AhR a aussi le potentiel d'influencer la réplication du VIH négativement ou positivement, probablement dépendamment de son état d'activation et du ligand avec lequel il interagit.

Ces études du transcriptome au niveau du génome entier ont également permis l'identification de plusieurs autres gènes d'intérêt, dont le récepteur de chimiokines CXCR6 et les molécules d'adhésion CEACAM1, MCAM et ALCAM. L'expression différentielle de ces molécules au niveau protéique devra être validée par cytométrie en flux et/ou microscopie confocale avant de poursuivre dans les études mécanistiques de ces autres marqueurs pouvant influencer la pathogenèse du VIH.

Concernant l'objectif 4 de ce travail de recherche, soit l'identification du niveau auquel les facteurs de permissivité sélectionnés interfèrent avec le cycle de réplication du VIH, nous avons suggéré que PPAR $\gamma$  interfère principalement à des niveaux post-intégration, alors que le double rôle d'AhR dans la régulation de la permissivité au VIH reste à approfondir de point de vue mécanistique. Des expériences d'infection avec un virus du VIH pseudotypé VSV-G (*vesicular stomatitis virus protein G*) dit à cycle unique de réplication menées au laboratoire permettront prochainement de clarifier les différences potentielles au niveau de l'entrée virale *versus* les étapes post-entrée. Nous envisageons également des expériences en microscopie confocale à fluorescence afin d'observer la localisation cellulaire d'AhR avant et après activation de la voie, en plus de vérifier s'il y a colocalisation d'AhR avec certaines protéines virales. De plus, l'utilisation des cellules ACH2 (obtenues du NIH) portant une copie du génome viral par cellule pourra servir à préciser le rôle de PPAR $\gamma$  et AhR dans la transcription virale.

Finalement, nous suggérons de mener des essais cliniques pour tester les effets de l'activation de la voie PPAR $\gamma$  en primo infection pour en déterminer les conséquences sur l'établissement et le maintien du réservoir viral. Nous planifions également mesurer les effets sur la réplication virale de d'autres agonistes spécifiques de PPAR $\gamma$ , dont son agoniste naturel PGJ2. La poursuite de ces études pourrait ainsi permettre le développement de thérapies antirétrovirales ciblant spécifiquement les populations cellulaires les plus permissives à l'infection.

## 6. BIBLIOGRAPHIE

1. Castro, K. G., J. W. Ward, L. Slutsker, J. W. Buehler, H. W. Jaffe, and R. L. Berkelman. 1993. Revised Classification System for HIV Infection and Expanded Surveillance Case Definition for AIDS Among Adolescents and Adults. Center for Disease Control, Atlanta.
2. Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
3. Montagnier, L., J. C. Chermann, F. Barre-Sinoussi, D. Klatzmann, S. Wain-Hobson, M. Alizon, F. Clavel, F. Brun-Vezinet, E. Vilmer, C. Rouzioux, and et al. 1984. Lymphadenopathy associated virus and its etiological role in AIDS. *Princess Takamatsu Symp* 15: 319-331.
4. Popovic, M., M. G. Sarngadharan, E. Read, and R. C. Gallo. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.
5. Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and et al. 1986. Human immunodeficiency viruses. *Science* 232: 697.
6. Hill, M., G. Tachedjian, and J. Mak. 2005. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr HIV Res* 3: 73-85.
7. Santiago, M. L., F. Range, B. F. Keele, Y. Li, E. Bailes, F. Bibollet-Ruche, C. Fruteau, R. Noe, M. Peeters, J. F. Brookfield, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn. 2005. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J Virol* 79: 12515-12527.
8. Martinez-Steele, E., A. A. Awasana, T. Corrah, S. Sabally, M. van der Sande, A. Jaye, T. Togun, R. Sarge-Njie, S. J. McConkey, H. Whittle, and M. F. Schim van der Loeff. 2007. Is HIV-2- induced AIDS different from HIV-1-associated AIDS? Data from a West African clinic. *Aids* 21: 317-324.
9. Charneau, P., A. M. Borman, C. Quillent, D. Guetard, S. Chamaret, J. Cohen, G. Remy, L. Montagnier, and F. Clavel. 1994. Isolation and envelope sequence of a highly divergent HIV-1 isolate: definition of a new HIV-1 group. *Virology* 205: 247-253.
10. Wainberg, M. A. 2004. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *Aids* 18 Suppl 3: S63-68.
11. WHO, UNICEF, and UNAIDS. 2011. Progress report 2011: Global HIV/AIDS response. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
12. Greene, W. C., and B. M. Peterlin. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* 8: 673-680.
13. Van der Sluis, R. M., G. Pollakis, M. L. van Gerven, B. Berkhout, and R. E. Jeeninga. 2011. Latency profiles of full length HIV-1 molecular clone variants with a subtype specific promoter. *Retrovirology* 8: 73.
14. Votteler, J., L. Neumann, S. Hahn, F. Hahn, P. Rauch, K. Schmidt, N. Studtucker, S. M. Solbak, T. Fossen, P. Henklein, D. E. Ott, G. Holland, N. Bannert, and U. Schubert. 2011. Highly conserved serine residue 40 in HIV-1 p6 regulates capsid processing and virus core assembly. *Retrovirology* 8: 11.
15. Jeang, K.-T., ed. 2007. *HIV-1: Molecular Biology and Pathogenesis: Viral Mechanisms, 2nd edition*. Elsevier, San Diego, California.
16. Hallenberger, S., V. Bosch, H. Angliker, E. Shaw, H. D. Klenk, and W. Garten. 1992. Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* 360: 358-361.
17. Wei, P., M. E. Garber, S. M. Fang, W. H. Fischer, and K. A. Jones. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92: 451-462.
18. Liang, C., and M. A. Wainberg. 2002. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev* 4: 41-49.
19. Cockrell, A. S., H. van Praag, N. Santistevan, H. Ma, and T. Kafri. 2011. The HIV-1 Rev/RRE system is required for HIV-1 5' UTR cis elements to augment encapsidation of heterologous RNA into HIV-1 viral particles. *Retrovirology* 8: 51.
20. Wonderlich, E. R., J. A. Leonard, and K. L. Collins. 2011. HIV immune evasion disruption of antigen presentation by the HIV Nef protein. *Adv Virus Res* 80: 103-127.

21. Willey, R. L., F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein regulates the formation of intracellular gp160-CD4 complexes. *J Virol* 66: 226-234.
22. Romani, B., and S. Engelbrecht. 2009. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. *J Gen Virol* 90: 1795-1805.
23. Marin, M., K. M. Rose, S. L. Kozak, and D. Kabat. 2003. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med* 9: 1398-1403.
24. Hoglund, S., A. Ohagen, K. Lawrence, and D. Gabuzda. 1994. Role of vif during packing of the core of HIV-1. *Virology* 201: 349-355.
25. Klatzmann, D., E. Champagne, S. Chamaret, J. Gruest, D. Guetard, T. Hercend, J. C. Gluckman, and L. Montagnier. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-768.
26. Maddon, P. J., A. G. Dalgleish, J. S. McDougal, P. R. Clapham, R. A. Weiss, and R. Axel. 1986. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47: 333-348.
27. Stevenson, M. 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9: 853-860.
28. Berger, E. A., R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240.
29. Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-877.
30. Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. Di Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, and N. R. Landau. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.
31. Dragic, T., V. Litwin, G. P. Allaway, S. R. Martin, Y. Huang, K. A. Nagashima, C. Cayan, P. J. Maddon, R. A. Koup, J. P. Moore, and W. A. Paxton. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381: 667-673.
32. Zhang, L., Y. Huang, T. He, Y. Cao, and D. D. Ho. 1996. HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* 383: 768.
33. Parrish, N. F., C. B. Wilen, L. B. Banks, S. S. Iyer, J. M. Pfaff, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Decker, E. H. Parrish, A. Berg, J. Hopper, B. Hora, A. Kumar, T. Mahlokozera, S. Yuan, C. Coleman, M. Vermeulen, H. Ding, C. Ochsenbauer, J. C. Tilton, S. R. Permar, J. C. Kappes, M. R. Betts, M. P. Busch, F. Gao, D. Montefiori, B. F. Haynes, G. M. Shaw, B. H. Hahn, and R. W. Doms. 2012. Transmitted/founder and chronic subtype C HIV-1 use CD4 and CCR5 receptors with equal efficiency and are not inhibited by blocking the integrin alpha4beta7. *PLoS Pathog* 8: e1002686.
34. Bunnik, E. M., L. C. Swenson, D. Edo-Matas, W. Huang, W. Dong, A. Frantz, C. J. Petropoulos, E. Coakley, H. Schuitemaker, P. R. Harrigan, and A. B. van 't Wout. 2011. Detection of inferred CCR5- and CXCR4-using HIV-1 variants and evolutionary intermediates using ultra-deep pyrosequencing. *PLoS Pathog* 7: e1002106.
35. Bermejo, M., J. Martin-Serrano, E. Oberlin, M. A. Pedraza, A. Serrano, B. Santiago, A. Caruz, P. Loetscher, M. Baggiolini, F. Arenzana-Seisdedos, and J. Alcamí. 1998. Activation of blood T lymphocytes down-regulates CXCR4 expression and interferes with propagation of X4 HIV strains. *Eur J Immunol* 28: 3192-3204.
36. Nishimura, Y., C. R. Brown, J. J. Mattapallil, T. Igarashi, A. Buckler-White, B. A. Lafont, V. M. Hirsch, M. Roederer, and M. A. Martin. 2005. Resting naive CD4+ T cells are massively infected and eliminated by X4-tropic simian-human immunodeficiency viruses in macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8000-8005.
37. Freed, E. O., and A. J. Mouland. 2006. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 3: 77.
38. Rambaut, A., D. Posada, K. A. Crandall, and E. C. Holmes. 2004. The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet* 5: 52-61.
39. Center, R. J., R. D. Leapman, J. Lebowitz, L. O. Arthur, P. L. Earl, and B. Moss. 2002. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein on the virion surface. *J Virol* 76: 7863-7867.
40. Sattentau, Q. J. 1992. CD4 activation of HIV fusion. *Int J Cell Cloning* 10: 323-332.
41. Myszka, D. G., R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, and M. L. Doyle. 2000. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9026-9031.

42. Rizzuto, C. D., R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, and J. Sodroski. 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280: 1949-1953.
43. Jones, P. L., T. Korte, and R. Blumenthal. 1998. Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors. *J Biol Chem* 273: 404-409.
44. Chang, D. K., S. F. Cheng, and W. J. Chien. 1997. The amino-terminal fusion domain peptide of human immunodeficiency virus type 1 gp41 inserts into the sodium dodecyl sulfate micelle primarily as a helix with a conserved glycine at the micelle-water interface. *J Virol* 71: 6593-6602.
45. Melikyan, G. B., R. M. Markosyan, H. Hemmati, M. K. Delmedico, D. M. Lambert, and F. S. Cohen. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* 151: 413-423.
46. Farnet, C. M., and F. D. Bushman. 1996. HIV cDNA integration: molecular biology and inhibitor development. *Aids* 10 Suppl A: S3-11.
47. Telesnitsky, A., and S. P. Goff. 1997. Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA.
48. Basu, V. P., M. Song, L. Gao, S. T. Rigby, M. N. Hanson, and R. A. Bambara. 2008. Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res* 134: 19-38.
49. Miller, M. D., C. M. Farnet, and F. D. Bushman. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* 71: 5382-5390.
50. Suhasini, M., and T. R. Reddy. 2009. Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Curr HIV Res* 7: 91-100.
51. McCune, J. M., L. B. Rabin, M. B. Feinberg, M. Lieberman, J. C. Kosek, G. R. Reyes, and I. L. Weissman. 1988. Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53: 55-67.
52. Strack, B., A. Calistri, S. Craig, E. Popova, and H. G. Gottlinger. 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 114: 689-699.
53. Baumgartel, V., S. Ivanchenko, A. Dupont, M. Sergeev, P. W. Wiseman, H. G. Krausslich, C. Brauchle, B. Muller, and D. C. Lamb. 2011. Live-cell visualization of dynamics of HIV budding site interactions with an ESCRT component. *Nat Cell Biol* 13: 469-474.
54. Kondo, E., and H. G. Gottlinger. 1996. A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J Virol* 70: 159-164.
55. Tozser, J. 2003. Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention. *Curr Top Med Chem* 3: 1447-1457.
56. Zheng, Y. H., N. Lovsin, and B. M. Peterlin. 2005. Newly identified host factors modulate HIV replication. *Immunol Lett* 97: 225-234.
57. Grossman, Z., M. Meier-Schellersheim, W. E. Paul, and L. J. Picker. 2006. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat Med* 12: 289-295.
58. Kahn, J. O., and B. D. Walker. 1998. Acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* 339: 33-39.
59. Scarlatti, G., E. Tresoldi, A. Bjorndal, R. Fredriksson, C. Colognesi, H. K. Deng, M. S. Malnati, A. Plebani, A. G. Siccardi, D. R. Littman, E. M. Fenyo, and P. Lusso. 1997. In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression. *Nat Med* 3: 1259-1265.
60. Doms, R. W. 2001. Chemokine receptors and HIV entry. *Aids* 15 Suppl 1: S34-35.
61. Veazey, R. S., I. C. Tham, K. G. Mansfield, M. DeMaria, A. E. Forand, D. E. Shvetz, L. V. Chalifoux, P. K. Sehgal, and A. A. Lackner. 2000. Identifying the target cell in primary simian immunodeficiency virus (SIV) infection: highly activated memory CD4(+) T cells are rapidly eliminated in early SIV infection in vivo. *J Virol* 74: 57-64.
62. Rueda, C. M., P. A. Velilla, C. A. Chougnet, C. J. Montoya, and M. T. Rugeles. 2012. HIV-induced T-cell activation/exhaustion in rectal mucosa is controlled only partially by antiretroviral treatment. *PLoS One* 7: e30307.
63. Douek, D. C., L. J. Picker, and R. A. Koup. 2003. T cell dynamics in HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 21: 265-304.
64. Simmons, A., V. Aluvihare, and A. McMichael. 2001. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity* 14: 763-777.
65. Cicala, C., J. Arthos, S. M. Selig, G. Dennis, Jr., D. A. Hosack, D. Van Ryk, M. L. Spangler, T. D. Steenbeke, P. Khazanie, N. Gupta, J. Yang, M. Daucher, R. A. Lempicki, and A. S. Fauci. 2002. HIV envelope induces a cascade of cell signals in non-proliferating target cells that favor virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9380-9385.

66. Wang, L., S. Mukherjee, F. Jia, O. Narayan, and L. J. Zhao. 1995. Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and trans-activation of viral long terminal repeat. *J Biol Chem* 270: 25564-25569.
67. Demarchi, F., M. I. Gutierrez, and M. Giacca. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 tat protein activates transcription factor NF-kappaB through the cellular interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Virol* 73: 7080-7086.
68. Blankson, J. N., D. Persaud, and R. F. Siliciano. 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med* 53: 557-593.
69. Mowat, A. M., and J. L. Viney. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* 156: 145-166.
70. Qin, S., J. B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A. E. Koch, B. Moser, and C. R. Mackay. 1998. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J Clin Invest* 101: 746-754.
71. Vieillard, V., J. L. Strominger, and P. Debre. 2005. NK cytotoxicity against CD4+ T cells during HIV-1 infection: a gp41 peptide induces the expression of an NKp44 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10981-10986.
72. Leng, Q., G. Borkow, Z. Weisman, M. Stein, A. Kalinkovich, and Z. Bentwich. 2001. Immune activation correlates better than HIV plasma viral load with CD4 T-cell decline during HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27: 389-397.
73. Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks, and D. C. Douek. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365-1371.
74. Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387: 183-188.
75. Dion, M. L., J. F. Poulin, R. Bordi, M. Sylvestre, R. Corsini, N. Kettaf, A. Dalloul, M. R. Boulassel, P. Debre, J. P. Routy, Z. Grossman, R. P. Sekaly, and R. Cheynier. 2004. HIV infection rapidly induces and maintains a substantial suppression of thymocyte proliferation. *Immunity* 21: 757-768.
76. Van Grevenynghe, J., R. Halwani, N. Chomont, P. Ancuta, Y. Peretz, A. Tanel, F. A. Procopio, Y. Shi, E. A. Said, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2008. Lymph node architecture collapse and consequent modulation of FOXO3a pathway on memory T- and B-cells during HIV infection. *Semin Immunol* 20: 196-203.
77. Dai, Z., and F. G. Lakkis. 2001. Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintaining the CD4, but not CD8, naive T cell pool. *J Immunol* 167: 6711-6715.
78. Bofill, M., G. Janossy, C. A. Lee, D. MacDonald-Burns, A. N. Phillips, C. Sabin, A. Timms, M. A. Johnson, and P. B. Kernoff. 1992. Laboratory control values for CD4 and CD8 T lymphocytes. Implications for HIV-1 diagnosis. *Clin Exp Immunol* 88: 243-252.
79. Chu, C., and P. A. Selwyn. 2011. Complications of HIV infection: a systems-based approach. *Am Fam Physician* 83: 395-406.
80. ONUSIDA. 1999. Maladies opportunistes liées au VIH : Actualisation ONUSIDA. Genève.
81. Pierson, T., J. McArthur, and R. F. Siliciano. 2000. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu Rev Immunol* 18: 665-708.
82. Janeway, C. A., P. Travers, W. Mark, and S. Mark, ed. 2001. *Immunobiology*. Garland Science, New York and London.
83. Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F. A. Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, M. R. Boulassel, G. Ghattas, J. M. Brenchley, T. W. Schacker, B. J. Hill, D. C. Douek, J. P. Routy, E. K. Haddad, and R. P. Sekaly. 2009. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med* 15: 893-900.
84. Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R. E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman, and R. F. Siliciano. 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278: 1295-1300.

85. Siliciano, J. D., J. Kajdas, D. Finzi, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. B. Margolick, C. Kovacs, S. J. Gange, and R. F. Siliciano. 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat Med* 9: 727-728.
86. Huber, K., G. Doyon, J. Plaks, E. Fyne, J. W. Mellors, and N. Sluis-Cremer. 2011. Inhibitors of histone deacetylases: correlation between isoform specificity and reactivation of HIV type 1 (HIV-1) from latently infected cells. *J Biol Chem* 286: 22211-22218.
87. Williams, S. A., L. F. Chen, H. Kwon, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Verdin, and W. C. Greene. 2006. NF-kappaB p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *EMBO J* 25: 139-149.
88. Marks, P. A., and M. Dokmanovic. 2005. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 14: 1497-1511.
89. Archin, N. M., A. L. Liberty, A. D. Kashuba, S. K. Choudhary, J. D. Kuruc, A. M. Crooks, D. C. Parker, E. M. Anderson, M. F. Kearney, M. C. Strain, D. D. Richman, M. G. Hudgens, R. J. Bosch, J. M. Coffin, J. J. Eron, D. J. Hazuda, and D. M. Margolis. 2012. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487: 482-485.
90. Freeman, G. J., A. J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L. J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M. C. Byrne, H. F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M. R. Bowman, B. M. Carreno, M. Collins, C. R. Wood, and T. Honjo. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192: 1027-1034.
91. Porichis, F., and D. E. Kaufmann. 2012. Role of PD-1 in HIV pathogenesis and as target for therapy. *Curr HIV/AIDS Rep* 9: 81-90.
92. DaFonseca, S., N. Chomont, M. E. Far, R. Boulassel, J. Routy, and R. Sékaly. 2010. Purging the HIV-1 reservoir through the disruption of the PD-1 pathway. *Journal of the International AIDS Society* 13.
93. Wolschendorf, F. 2012. HIV-1 Latency Establishment Is Controlled by a Short Promoter Element in the Viral LTR. In *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI) 2012*, Seattle, WA, USA.
94. Miller, C. J., Q. Li, K. Abel, E. Y. Kim, Z. M. Ma, S. Wietgreffe, L. La Franco-Scheuch, L. Compton, L. Duan, M. D. Shore, M. Zupancic, M. Busch, J. Carlis, S. Wolinsky, and A. T. Haase. 2005. Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J Virol* 79: 9217-9227.
95. Eger, K. A., and D. Unutmaz. 2005. The innate immune system and HIV pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 2: 10-15.
96. Werling, D., and T. W. Jungi. 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol* 91: 1-12.
97. Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton, and R. I. Lehrer. 1985. Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* 76: 1427-1435.
98. Wang, W., S. M. Owen, D. L. Rudolph, A. M. Cole, T. Hong, A. J. Waring, R. B. Lal, and R. I. Lehrer. 2004. Activity of alpha- and theta-defensins against primary isolates of HIV-1. *J Immunol* 173: 515-520.
99. Mackewicz, C. E., J. Yuan, P. Tran, L. Diaz, E. Mack, M. E. Selsted, and J. A. Levy. 2003. alpha-Defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors. *AIDS* 17: F23-32.
100. Nikolova, M., L. Boumsell, and A. Bensussan. 2001. The receptors regulating natural cytotoxic effector functions. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 49: 91-99.
101. Sawicki, M. W., N. Dimasi, K. Natarajan, J. Wang, D. H. Margulies, and R. A. Mariuzza. 2001. Structural basis of MHC class I recognition by natural killer cell receptors. *Immunol Rev* 181: 52-65.
102. Mavilio, D., J. Benjamin, M. Daucher, G. Lombardo, S. Kottlil, M. A. Planta, E. Marcenaro, C. Bottino, L. Moretta, A. Moretta, and A. S. Fauci. 2003. Natural killer cells in HIV-1 infection: dichotomous effects of viremia on inhibitory and activating receptors and their functional correlates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15011-15016.
103. Robertson, M. J. 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71: 173-183.
104. Younes, S. A., B. Yassine-Diab, A. R. Dumont, M. R. Boulassel, Z. Grossman, J. P. Routy, and R. P. Sekaly. 2003. HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4<sup>+</sup> T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198: 1909-1922.
105. Zaunders, J. J., S. Ip, M. L. Munier, D. E. Kaufmann, K. Suzuki, C. Brereton, S. C. Sasson, N. Seddiki, K. Koelsch, A. Landay, P. Grey, R. Finlayson, J. Kaldor, E. S. Rosenberg, B. D. Walker, B. Fazekas de St Groth, D. A. Cooper, and A. D. Kelleher. 2006. Infection of CD127<sup>+</sup> (interleukin-7 receptor<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4 T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 80: 10162-10172.

106. Yue, F. Y., A. Merchant, C. M. Kovacs, M. Loutfy, D. Persad, and M. A. Ostrowski. 2008. Virus-specific interleukin-17-producing CD4<sup>+</sup> T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82: 6767-6771.
107. Paul, W. E., ed. 2003. *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
108. Oxenius, A., D. A. Price, P. J. Easterbrook, C. A. O'Callaghan, A. D. Kelleher, J. A. Whelan, G. Sontag, A. K. Sewell, and R. E. Phillips. 2000. Early highly active antiretroviral therapy for acute HIV-1 infection preserves immune function of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 3382-3387.
109. Douek, D. C., J. M. Brenchley, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, Y. Okamoto, J. P. Casazza, J. Kuruppu, K. Kunstman, S. Wolinsky, Z. Grossman, M. Dybul, A. Oxenius, D. A. Price, M. Connors, and R. A. Koup. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature* 417: 95-98.
110. Munier, M. L., and A. D. Kelleher. 2007. Acutely dysregulated, chronically disabled by the enemy within: T-cell responses to HIV-1 infection. *Immunol Cell Biol* 85: 6-15.
111. Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol* 68: 4650-4655.
112. Walker, B. D., S. Chakrabarti, B. Moss, T. J. Paradis, T. Flynn, A. G. Durno, R. S. Blumberg, J. C. Kaplan, M. S. Hirsch, and R. T. Schooley. 1987. HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* 328: 345-348.
113. Migueles, S. A., C. M. Osborne, C. Royce, A. A. Compton, R. P. Joshi, K. A. Weeks, J. E. Rood, A. M. Berkley, J. B. Sacha, N. A. Coglianor-Shutta, M. Lloyd, G. Roby, R. Kwan, M. McLaughlin, S. Stallings, C. Rehm, M. A. O'Shea, J. Mican, B. Z. Packard, A. Komoriya, S. Palmer, A. P. Wiegand, F. Maldarelli, J. M. Coffin, J. W. Mellors, C. W. Hallahan, D. A. Follman, and M. Connors. 2008. Lytic granule loading of CD8<sup>+</sup> T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29: 1009-1021.
114. Muller, P., M. Engelstadter, A. Werner, J. Braner, S. Staszewski, V. Miller, H. W. Doerr, R. Kurth, and K. Cichutek. 1997. Increased serum and mRNA levels of RANTES associated with elevated levels of activated CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> T cells in HIV-1 infected individuals. *Intervirology* 40: 263-270.
115. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8<sup>+</sup> T cells. *Science* 270: 1811-1815.
116. Champagne, P., G. S. Ogg, A. S. King, C. Knabenhans, K. Ellefsen, M. Nobile, V. Appay, G. P. Rizzardi, S. Fleury, M. Lipp, R. Forster, S. Rowland-Jones, R. P. Sekaly, A. J. McMichael, and G. Pantaleo. 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410: 106-111.
117. Kaufmann, D. E., and B. D. Walker. 2009. PD-1 and CTLA-4 inhibitory cosignaling pathways in HIV infection and the potential for therapeutic intervention. *J Immunol* 182: 5891-5897.
118. Yang, Z. Z., D. M. Grote, S. C. Ziesmer, T. Niki, M. Hirashima, A. J. Novak, T. E. Witzig, and S. M. Ansell. 2012. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Invest* 122: 1271-1282.
119. Zhu, C., A. C. Anderson, A. Schubart, H. Xiong, J. Imitola, S. J. Khoury, X. X. Zheng, T. B. Strom, and V. K. Kuchroo. 2005. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* 6: 1245-1252.
120. Jones, R. B., L. C. Ndhlovu, J. D. Barbour, P. M. Sheth, A. R. Jha, B. R. Long, J. C. Wong, M. Satkunarajah, M. Schweneker, J. M. Chapman, G. Gyenes, B. Vali, M. D. Hycza, F. Y. Yue, C. Kovacs, A. Sassi, M. Loutfy, R. Halpenny, D. Persad, G. Spotts, F. M. Hecht, T. W. Chun, J. M. McCune, R. Kaul, J. M. Rini, D. F. Nixon, and M. A. Ostrowski. 2008. Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 205: 2763-2779.
121. Stamatatos, L., L. Morris, D. R. Burton, and J. R. Mascola. 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med* 15: 866-870.
122. Gray, E. S., M. C. Madiga, P. L. Moore, K. Mlisana, S. S. Abdool Karim, J. M. Binley, G. M. Shaw, J. R. Mascola, and L. Morris. 2009. Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J Virol* 83: 11265-11274.
123. Kindt, T. J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A., ed. 2008. *Immunologie, 6e édition*. Dunod, Paris.
124. Tomaras, G. D., N. L. Yates, P. Liu, L. Qin, G. G. Fouda, L. L. Chavez, A. C. Decamp, R. J. Parks, V. C. Ashley, J. T. Lucas, M. Cohen, J. Eron, C. B. Hicks, H. X. Liao, S. G. Self, G. Landucci, D. N. Forthal, K. J. Weinhold, B. F. Keele, B. H. Hahn, M. L. Greenberg, L. Morris, S. S. Karim, W. A. Blattner, D. C. Montefiori, G. M. Shaw, A. S. Perelson, and B. F. Haynes. 2008. Initial B-cell responses to transmitted

- human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J Virol* 82: 12449-12463.
125. De Milito, A. 2004. B lymphocyte dysfunctions in HIV infection. *Curr HIV Res* 2: 11-21.
  126. Kolata, G. 1987. FDA approves AZT. *Science* 235: 1570.
  127. Ezzell, C. 1987. AZT given the green light for clinical treatment of AIDS. *Nature* 326: 430.
  128. Folkers, G. 1996. Two new protease inhibitors approved by FDA. Food and Drug Administration. *NIAID AIDS Agenda*: 4-5.
  129. Ho, D. D. 1995. Time to hit HIV, early and hard. *N Engl J Med* 333: 450-451.
  130. Ledergerber, B., M. Egger, M. Opravil, A. Telenti, B. Hirschel, M. Battegay, P. Vernazza, P. Sudre, M. Flepp, H. Furrer, P. Francioli, and R. Weber. 1999. Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* 353: 863-868.
  131. Sayana, S., and H. Khanlou. 2009. Maraviroc: a new CCR5 antagonist. *Expert Rev Anti Infect Ther* 7: 9-19.
  132. Fatkenheuer, G., A. L. Pozniak, M. A. Johnson, A. Plettenberg, S. Staszewski, A. I. Hoepelman, M. S. Saag, F. D. Goebel, J. K. Rockstroh, B. J. Dezube, T. M. Jenkins, C. Medhurst, J. F. Sullivan, C. Ridgway, S. Abel, I. T. James, M. Youle, and E. van der Ryst. 2005. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med* 11: 1170-1172.
  133. Buzon, M. J., M. Massanella, J. M. Llibre, A. Esteve, V. Dahl, M. C. Puertas, J. M. Gatell, P. Domingo, R. Paredes, M. Sharkey, S. Palmer, M. Stevenson, B. Clotet, J. Blanco, and J. Martinez-Picado. 2010. HIV-1 replication and immune dynamics are affected by raltegravir intensification of HAART-suppressed subjects. *Nat Med* 16: 460-465.
  134. Autran, B., G. Carcelain, T. S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debre, and J. Leibowitch. 1997. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 277: 112-116.
  135. Kostense, S., F. M. Raaphorst, J. Joling, D. W. Notermans, J. M. Prins, S. A. Danner, P. Reiss, J. M. Lange, J. M. Teale, and F. Miedema. 2001. T cell expansions in lymph nodes and peripheral blood in HIV-1-infected individuals: effect of antiretroviral therapy. *AIDS* 15: 1097-1107.
  136. Bucy, R. P., R. D. Hockett, C. A. Derdeyn, M. S. Saag, K. Squires, M. Sillers, R. T. Mitsuyasu, and J. M. Kilby. 1999. Initial increase in blood CD4(+) lymphocytes after HIV antiretroviral therapy reflects redistribution from lymphoid tissues. *J Clin Invest* 103: 1391-1398.
  137. Amiryan-Chevillard, N., H. Tissot-Dupont, Y. Obadia, H. Gallais, J. L. Mege, and C. Capo. 2000. Highly active antiretroviral therapy (HAART) and circulating markers of immune activation: specific effect of HAART on neopterin. *Clin Diagn Lab Immunol* 7: 832-834.
  138. Schmit, J. C., and B. Weber. 1997. Recent advances in antiretroviral therapy and HIV infection monitoring. *Intervirology* 40: 304-321.
  139. Mathe, G. 1997. Hypothetical reasons of the HIV1-AIDS "tritherapy" failure. A challenging model. *Biomed Pharmacother* 51: 413-416.
  140. Wang, F. X., Y. Xu, J. Sullivan, E. Souder, E. G. Argyris, E. A. Acheampong, J. Fisher, M. Sierra, M. M. Thomson, R. Najera, I. Frank, J. Kulkosky, R. J. Pomerantz, and G. Nunnari. 2005. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J Clin Invest* 115: 128-137.
  141. Varatharajan, L., and S. A. Thomas. 2009. The transport of anti-HIV drugs across blood-CNS interfaces: summary of current knowledge and recommendations for further research. *Antiviral Res* 82: A99-109.
  142. NIAID, and NIH. 2007. An Update Regarding the HVTN 502 and HVTN 503 HIV Vaccine Trials. National Institutes of Health, Bethesda.
  143. Buchbinder, S. P., D. V. Mehrotra, A. Duerr, D. W. Fitzgerald, R. Mogg, D. Li, P. B. Gilbert, J. R. Lama, M. Marmor, C. Del Rio, M. J. McElrath, D. R. Casimiro, K. M. Gottesdiener, J. A. Chodakewitz, L. Corey, and M. N. Robertson. 2008. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* 372: 1881-1893.
  144. Perreau, M., G. Pantaleo, and E. J. Kremer. 2008. Activation of a dendritic cell-T cell axis by Ad5 immune complexes creates an improved environment for replication of HIV in T cells. *J Exp Med* 205: 2717-2725.
  145. NIAID, and NIH. 2009. HIV Vaccine Regimen Demonstrates Modest Preventive Effect in Thailand Clinical Study. National Institutes of Health, Bethesda.



146. Adis International Ltd. 2003. HIV gp120 vaccine - VaxGen: AIDSVAX, AIDSVAX B/B, AIDSVAX B/E, HIV gp120 vaccine - Genentech, HIV gp120 vaccine AIDSVAX - VaxGen, HIV vaccine AIDSVAX - VaxGen. In *Drugs R D*, 2003/07/10 ed. 249-253.
147. Rerks-Ngarm, S., P. Pitisuttithum, S. Nitayaphan, J. Kaewkungwal, J. Chiu, R. Paris, N. Premisri, C. Namwat, M. de Souza, E. Adams, M. Benenson, S. Gurunathan, J. Tartaglia, J. G. McNeil, D. P. Francis, D. Stablein, D. L. Birx, S. Chunsuttiwat, C. Khamboonruang, P. Thongcharoen, M. L. Robb, N. L. Michael, P. Kunasol, and J. H. Kim. 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med* 361: 2209-2220.
148. Zhou, T., I. Georgiev, X. Wu, Z. Y. Yang, K. Dai, A. Finzi, Y. D. Kwon, J. F. Scheid, W. Shi, L. Xu, Y. Yang, J. Zhu, M. C. Nussenzweig, J. Sodroski, L. Shapiro, G. J. Nabel, J. R. Mascola, and P. D. Kwong. 2010. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science* 329: 811-817.
149. Walker, L. M., M. Huber, K. J. Doores, E. Falkowska, R. Pejchal, J. P. Julien, S. K. Wang, A. Ramos, P. Y. Chan-Hui, M. Moyle, J. L. Mitcham, P. W. Hammond, O. A. Olsen, P. Phung, S. Fling, C. H. Wong, S. Phogat, T. Wrin, M. D. Simek, W. C. Koff, I. A. Wilson, D. R. Burton, and P. Poignard. 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature* 477: 466-470.
150. Sekaly, R. P. 2008. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med* 205: 7-12.
151. Virgin, H. W., and B. D. Walker. 2010. Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature* 464: 224-231.
152. Austyn, J. M. 2000. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 162: S146-150.
153. Rodriguez-Pinto, D. 2005. B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 238: 67-75.
154. Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, and I. A. Wilson. 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 24: 419-466.
155. Nishana, M., and S. C. Raghavan. 2012. Role of RAGs in the Generation of Antigen Receptor Diversity and Beyond. *Immunology*.
156. Gellert, M. 2002. V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71: 101-132.
157. DeFord-Watts, L. M., D. S. Dougall, S. Belkaya, B. A. Johnson, J. L. Eitson, K. T. Roybal, B. Barylko, J. P. Albanesi, C. Wulfig, and N. S. van Oers. 2011. The CD3 zeta subunit contains a phosphoinositide-binding motif that is required for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse. *J Immunol* 186: 6839-6847.
158. Yin, Y., X. X. Wang, and R. A. Mariuzza. 2012. Crystal structure of a complete ternary complex of T-cell receptor, peptide-MHC, and CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5405-5410.
159. Janeway, C. A., Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1: 1-13.
160. Male, D., J. Brostoff, D. Roth, and I. Roitt, eds. 2006. *Immunology, Seventh edition*, Philadelphia.
161. Matzinger, P. 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296: 301-305.
162. Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky, and M. S. Jordan. 2009. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 27: 591-619.
163. Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285: 221-227.
164. Dustin, M. L. 2008. T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol Rev* 221: 77-89.
165. Tseng, S. Y., J. C. Waite, M. Liu, S. Vardhana, and M. L. Dustin. 2008. T cell-dendritic cell immunological synapses contain TCR-dependent CD28-CD80 clusters that recruit protein kinase C theta. *J Immunol* 181: 4852-4863.
166. Freiberg, B. A., H. Kupfer, W. Maslanik, J. Delli, J. Kappler, D. M. Zaller, and A. Kupfer. 2002. Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* 3: 911-917.
167. Roach, T., S. Slater, M. Koval, L. White, E. D. Cahir McFarland, M. Okumura, M. Thomas, and E. Brown. 1997. CD45 regulates Src family member kinase activity associated with macrophage integrin-mediated adhesion. *Curr Biol* 7: 408-417.
168. Cullinan, P., A. I. Sperling, and J. K. Burkhardt. 2002. The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev* 189: 111-122.
169. Yokosuka, T., M. Takamatsu, W. Kobayashi-Imanishi, A. Hashimoto-Tane, M. Azuma, and T. Saito. 2012. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med* 209: 1201-1217.

170. Jolly, C., K. Kashefi, M. Hollinshead, and Q. J. Sattentau. 2004. HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* 199: 283-293.
171. Piguet, V., and Q. Sattentau. 2004. Dangerous liaisons at the virological synapse. *J Clin Invest* 114: 605-610.
172. McDonald, D., L. Wu, S. M. Bohks, V. N. KewalRamani, D. Unutmaz, and T. J. Hope. 2003. Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300: 1295-1297.
173. Haase, A. T. 2010. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 464: 217-223.
174. ONUSIDA. 2009. Rapport annuel sur l'épidémie de SIDA. Genève.
175. Hladik, F., and G. F. Doncel. 2010. Preventing mucosal HIV transmission with topical microbicides: challenges and opportunities. *Antiviral Res* 88 Suppl 1: S3-9.
176. Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk. 2000. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 100: 587-597.
177. Hijazi, K., Y. Wang, C. Scala, S. Jeffs, C. Longstaff, D. Stieh, B. Haggarty, G. Vanham, D. Schols, J. Balzarini, I. M. Jones, J. Hoxie, R. Shattock, and C. G. Kelly. 2011. DC-SIGN increases the affinity of HIV-1 envelope glycoprotein interaction with CD4. *PLoS One* 6: e28307.
178. Hodges, A., K. Sharrocks, M. Edelmann, D. Baban, A. Moris, O. Schwartz, H. Drakesmith, K. Davies, B. Kessler, A. McMichael, and A. Simmons. 2007. Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication. *Nat Immunol* 8: 569-577.
179. Van Kooyk, Y., and T. B. Geijtenbeek. 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* 3: 697-709.
180. Nobile, C., A. Moris, F. Porrot, N. Sol-Foulon, and O. Schwartz. 2003. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated fusion by DC-SIGN. *J Virol* 77: 5313-5323.
181. Lee, B., G. Leslie, E. Soilleux, U. O'Doherty, S. Baik, E. Levroney, K. Flummerfelt, W. Swiggard, N. Coleman, M. Malim, and R. W. Doms. 2001. cis Expression of DC-SIGN allows for more efficient entry of human and simian immunodeficiency viruses via CD4 and a coreceptor. *J Virol* 75: 12028-12038.
182. Damjan, N. 2012. Characterization of HIV trafficking and DC-SIGN-mediated cytoskeleton rearrangement in the context of HIV transfer across dendritic cells-T lymphocytes infectious synapses. In *Faculté de médecine*. Université de Genève, Genève.
183. Nikolic, D. S., M. Lehmann, R. Felts, E. Garcia, F. P. Blanchet, S. Subramaniam, and V. Piguet. 2011. HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation. *Blood* 118: 4841-4852.
184. Nobile, C., D. Rudnicka, M. Hasan, N. Aulner, F. Porrot, C. Machu, O. Renaud, M. C. Prevost, C. Hivroz, O. Schwartz, and N. Sol-Foulon. 2010. HIV-1 Nef inhibits ruffles, induces filopodia, and modulates migration of infected lymphocytes. *J Virol* 84: 2282-2293.
185. Eugenin, E. A., P. J. Gaskill, and J. W. Berman. 2009. Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking. *Cell Immunol* 254: 142-148.
186. Sowinski, S., C. Jolly, O. Berninghausen, M. A. Purbhoo, A. Chauveau, K. Kohler, S. Oddos, P. Eissmann, F. M. Brodsky, C. Hopkins, B. Onfelt, Q. Sattentau, and D. M. Davis. 2008. Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10: 211-219.
187. Rudnicka, D., J. Feldmann, F. Porrot, S. Wietgreffe, S. Guadagnini, M. C. Prevost, J. Estaquier, A. T. Haase, N. Sol-Foulon, and O. Schwartz. 2009. Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses. *J Virol* 83: 6234-6246.
188. Fais, S., M. R. Capobianchi, I. Abbate, C. Castilletti, M. Gentile, P. Cordiali Fei, F. Ameglio, and F. Dianzani. 1995. Unidirectional budding of HIV-1 at the site of cell-to-cell contact is associated with co-polarization of intercellular adhesion molecules and HIV-1 viral matrix protein. *AIDS* 9: 329-335.
189. Jolly, C., I. Mitar, and Q. J. Sattentau. 2007. Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells. *J Virol* 81: 13916-13921.
190. McDonald, D., M. A. Vodicka, G. Lucero, T. M. Svitkina, G. G. Borisy, M. Emerman, and T. J. Hope. 2002. Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol* 159: 441-452.

191. Zlotnik, A., and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12: 121-127.
192. Nomiyama, H., N. Osada, and O. Yoshie. 2011. A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. *Dev Comp Immunol* 35: 705-715.
193. Charo, I. F., S. J. Myers, A. Herman, C. Franci, A. J. Connolly, and S. R. Coughlin. 1994. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2752-2756.
194. Power, C. A., A. Meyer, K. Nemeth, K. B. Bacon, A. J. Hoogewerf, A. E. Proudfoot, and T. N. Wells. 1995. Molecular cloning and functional expression of a novel CC chemokine receptor cDNA from a human basophilic cell line. *J Biol Chem* 270: 19495-19500.
195. Trautmann, A. 2005. Chemokines as immunotransmitters? *Nat Immunol* 6: 427-428.
196. Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188: 373-386.
197. Sallusto, F., P. Schaerli, P. Loetscher, C. Schaniel, D. Lenig, C. R. Mackay, S. Qin, and A. Lanzavecchia. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28: 2760-2769.
198. Sallusto, F., D. Lenig, C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 187: 875-883.
199. Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and J. Geginat. 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. *J Exp Med* 200: 725-735.
200. Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and G. Napolitani. 2007. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8: 639-646.
201. Olsson, J., M. Poles, A. L. Spetz, J. Elliott, L. Hultin, J. Giorgi, J. Andersson, and P. Anton. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with significant mucosal inflammation characterized by increased expression of CCR5, CXCR4, and beta-chemokines. *The Journal of infectious diseases* 182: 1625-1635.
202. Molon, B., G. Gri, M. Bettella, C. Gomez-Mouton, A. Lanzavecchia, A. C. Martinez, S. Manes, and A. Viola. 2005. T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 6: 465-471.
203. Troia-Cancio, P., and D. M. Asmuth. 2011. Lessons from maraviroc clinical trials. *Expert Rev Anti Infect Ther* 9: 649-651.
204. Unutmaz, D., W. Xiang, M. J. Sunshine, J. Campbell, E. Butcher, and D. R. Littman. 2000. The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. *J Immunol* 165: 3284-3292.
205. Limou, S., C. Coulonges, J. T. Herbeck, D. van Manen, P. An, S. Le Clerc, O. Delaneau, G. Diop, L. Taing, M. Montes, A. B. van't Wout, G. S. Gottlieb, A. Therwath, C. Rouzioux, J. F. Delfraissy, J. D. Lelievre, Y. Levy, S. Herberg, C. Dina, J. Phair, S. Donfield, J. J. Goedert, S. Buchbinder, J. Estaquier, F. Schachter, I. Gut, P. Froguel, J. I. Mullins, H. Schuitemaker, C. Winkler, and J. F. Zagury. 2010. Multiple-cohort genetic association study reveals CXCR6 as a new chemokine receptor involved in long-term nonprogression to AIDS. *The Journal of infectious diseases* 202: 908-915.
206. Kumar, V., O. Prakash, S. Manpreet, G. Sumedh, and B. Medhi. 2006. Genetic basis of HIV-1 resistance and susceptibility: an approach to understand correlation between human genes and HIV-1 infection. *Indian J Exp Biol* 44: 683-692.
207. Ancuta, P., P. Autissier, A. Wurcel, T. Zaman, D. Stone, and D. Gabuzda. 2006. CD16+ monocyte-derived macrophages activate resting T cells for HIV infection by producing CCR3 and CCR4 ligands. *J Immunol* 176: 5760-5771.
208. Ancuta, P., K. J. Kunstman, P. Autissier, T. Zaman, D. Stone, S. M. Wolinsky, and D. Gabuzda. 2006. CD16+ monocytes exposed to HIV promote highly efficient viral replication upon differentiation into macrophages and interaction with T cells. *Virology* 344: 267-276.
209. Matloubian, M., A. David, S. Engel, J. E. Ryan, and J. G. Cyster. 2000. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 1: 298-304.
210. van der Voort, R., V. Verweij, T. M. de Witte, E. Lasonder, G. J. Adema, and H. Dolstra. 2010. An alternatively spliced CXCL16 isoform expressed by dendritic cells is a secreted chemoattractant for CXCR6+ cells. *J Leukoc Biol* 87: 1029-1039.

211. Ancuta, P., K. Y. Liu, V. Misra, V. S. Wacleche, A. Gosselin, X. Zhou, and D. Gabuzda. 2009. Transcriptional profiling reveals developmental relationship and distinct biological functions of CD16+ and CD16- monocyte subsets. *BMC Genomics* 10: 403.
212. Ellery, P. J., E. Tippet, Y. L. Chiu, G. Paukovics, P. U. Cameron, A. Solomon, S. R. Lewin, P. R. Gorry, A. Jaworowski, W. C. Greene, S. Sonza, and S. M. Crowe. 2007. The CD16+ monocyte subset is more permissive to infection and preferentially harbors HIV-1 in vivo. *J Immunol* 178: 6581-6589.
213. Vignali, D. A., L. W. Collison, and C. J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8: 523-532.
214. Wilson, C. B., E. Rowell, and M. Sekimata. 2009. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 9: 91-105.
215. Boyton, R. J., and D. M. Altmann. 2002. Is selection for TCR affinity a factor in cytokine polarization? *Trends in immunology* 23: 526-529.
216. Zhou, L., M. M. Chong, and D. R. Littman. 2009. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* 30: 646-655.
217. Ansel, K. M., D. U. Lee, and A. Rao. 2003. An epigenetic view of helper T cell differentiation. *Nat Immunol* 4: 616-623.
218. Ivetic, A., and A. J. Ridley. 2004. The telling tail of L-selectin. *Biochem Soc Trans* 32: 1118-1121.
219. Chigaev, A., and L. A. Sklar. 2012. Aspects of VLA-4 and LFA-1 regulation that may contribute to rolling and firm adhesion. *Front Immunol* 3: 242.
220. Blue, M. L., G. Davis, P. Conrad, and K. Kelley. 1993. Specific cleavage of the alpha 4 integrin associated with activation of peripheral T lymphocytes. *Immunology* 78: 80-85.
221. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401: 708-712.
222. Forster, R., A. C. Davalos-Misslitz, and A. Rot. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8: 362-371.
223. Butcher, E. C., and L. J. Picker. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272: 60-66.
224. Reiss, Y., A. E. Proudfoot, C. A. Power, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194: 1541-1547.
225. Dwinell, M. B., N. Lugering, L. Eckmann, and M. F. Kagnoff. 2001. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120: 49-59.
226. Wang, C., S. G. Kang, J. Lee, Z. Sun, and C. H. Kim. 2009. The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2: 173-183.
227. Gosselin, A., P. Monteiro, N. Chomont, F. Diaz-Griffero, E. A. Said, S. Fonseca, V. Wacleche, M. El-Far, M. R. Boulassel, J. P. Routy, R. P. Sekaly, and P. Ancuta. 2010. Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol* 184: 1604-1616.
228. Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman, and L. H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669.
229. Lighvani, A. A., D. M. Frucht, D. Jankovic, H. Yamane, J. Aliberti, B. D. Hissong, B. V. Nguyen, M. Gadina, A. Sher, W. E. Paul, and J. J. O'Shea. 2001. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15137-15142.
230. Yoon, S. H., S. O. Yun, J. Y. Park, H. Y. Won, E. K. Kim, H. J. Sohn, H. I. Cho, and T. G. Kim. 2009. Selective addition of CXCR3(+) CCR4(-) CD4(+) Th1 cells enhances generation of cytotoxic T cells by dendritic cells in vitro. *Exp Mol Med* 41: 161-170.
231. Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber, and J. S. Remington. 1988. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516-518.
232. Williams, M. A., A. J. Tynnik, and M. J. Bevan. 2006. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature* 441: 890-893.
233. Rothermel, A. L., K. M. Gilbert, and W. O. Weigle. 1991. Differential abilities of Th1 and Th2 to induce polyclonal B cell proliferation. *Cell Immunol* 135: 1-15.
234. Rosloniec, E. F., K. Latham, and Y. B. Guedez. 2002. Paradoxical roles of IFN-gamma in models of Th1-mediated autoimmunity. *Arthritis Res* 4: 333-336.
235. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-173.
236. Le Gros, G., S. Z. Ben-Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* 172: 921-929.

237. Cote-Sierra, J., G. Foucras, L. Guo, L. Chiodetti, H. A. Young, J. Hu-Li, J. Zhu, and W. E. Paul. 2004. Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3880-3885.
238. Zhu, J., and W. E. Paul. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112: 1557-1569.
239. Kopf, M., G. Le Gros, M. Bachmann, M. C. Lamers, H. Bluethmann, and G. Kohler. 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 362: 245-248.
240. Longphre, M., D. Li, M. Gallup, E. Drori, C. L. Ordonez, T. Redman, S. Wenzel, D. E. Bice, J. V. Fahy, and C. Basbaum. 1999. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 104: 1375-1382.
241. Sallusto, F., C. R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277: 2005-2007.
242. Park, H., Z. Li, X. O. Yang, S. H. Chang, R. Nurieva, Y. H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6: 1133-1141.
243. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6: 1123-1132.
244. Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua, and D. R. Littman. 2006. The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell* 126: 1121-1133.
245. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238.
246. Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8: 942-949.
247. Yang, L., D. E. Anderson, C. Baecher-Allan, W. D. Hastings, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo, and D. A. Hafler. 2008. IL-21 and TGF- $\beta$  are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* 454: 350-352.
248. Pappu, R., S. Rutz, and W. Ouyang. 2012. Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends in immunology* 33: 343-349.
249. Laan, M., J. Lotvall, K. F. Chung, and A. Linden. 2001. IL-17-induced cytokine release in human bronchial epithelial cells in vitro: role of mitogen-activated protein (MAP) kinases. *Br J Pharmacol* 133: 200-206.
250. Nozato, K., J. Fujita, M. Kawaguchi, G. Ohara, Y. Morishima, Y. Ishii, S. K. Huang, F. Kokubu, H. Satoh, and N. Hizawa. 2011. IL-17F Induces CCL20 in Bronchial Epithelial Cells. *J Allergy (Cairo)* 2011: 587204.
251. Ghannam, S., C. Dejou, N. Pedretti, J. P. Giot, K. Dorgham, H. Boukhaddaoui, V. Deleuze, F. X. Bernard, C. Jorgensen, H. Yssel, and J. Pene. 2011. CCL20 and beta-defensin-2 induce arrest of human Th17 cells on inflamed endothelium in vitro under flow conditions. *J Immunol* 186: 1411-1420.
252. Zhou, L., Ivanov, II, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D. E. Levy, W. J. Leonard, and D. R. Littman. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 8: 967-974.
253. Yang, F., W. F. Wu, Y. L. Yan, Y. Pang, Q. Kong, and Y. L. Huang. 2011. Expression of IL-23/Th17 pathway in a murine model of Coxsackie virus B3-induced viral myocarditis. *Virol J* 8: 301.
254. Stritesky, G. L., N. Yeh, and M. H. Kaplan. 2008. IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *J Immunol* 181: 5948-5955.
255. Mizoguchi, A. 2012. Healing of intestinal inflammation by IL-22. *Inflamm Bowel Dis* 18: 1777-1784.
256. Rubino, S. J., K. Geddes, and S. E. Girardin. 2012. Innate IL-17 and IL-22 responses to enteric bacterial pathogens. *Trends in immunology* 33: 112-118.
257. Berlin, C., E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann, and E. C. Butcher. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74: 185-195.
258. Brenchley, J. M., and D. C. Douek. 2008. HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 1: 23-30.
259. Ancuta, P., P. Monteiro, and R. P. Sekaly. 2010. Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS* 5: 158-165.

260. Brass, A. L., D. M. Dykxhoorn, Y. Benita, N. Yan, A. Engelman, R. J. Xavier, J. Lieberman, and S. J. Elledge. 2008. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319: 921-926.
261. Goff, S. P. 2008. Knockdown screens to knockout HIV-1. *Cell* 135: 417-420.
262. Konig, R., Y. Zhou, D. Elleder, T. L. Diamond, G. M. Bonamy, J. T. Irelan, C. Y. Chiang, B. P. Tu, P. D. De Jesus, C. E. Lilley, S. Seidel, A. M. Opaluch, J. S. Caldwell, M. D. Weitzman, K. L. Kuhen, S. Bandyopadhyay, T. Ideker, A. P. Orth, L. J. Miraglia, F. D. Bushman, J. A. Young, and S. K. Chanda. 2008. Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135: 49-60.
263. Zhou, H., M. Xu, Q. Huang, A. T. Gates, X. D. Zhang, J. C. Castle, E. Stec, M. Ferrer, B. Strulovici, D. J. Hazuda, and A. S. Espeseth. 2008. Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4: 495-504.
264. Benarafa, C., and E. Remold-O'Donnell. 2005. The ovalbumin serpins revisited: perspective from the chicken genome of clade B serpin evolution in vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11367-11372.
265. Grilli, M., J. J. Chiu, and M. J. Lenardo. 1993. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 143: 1-62.
266. Bours, V., G. Franzoso, K. Brown, S. Park, V. Azarenko, M. Tomita-Yamaguchi, K. Kelly, and U. Siebenlist. 1992. Lymphocyte activation and the family of NF-kappa B transcription factor complexes. *Curr Top Microbiol Immunol* 182: 411-420.
267. Sen, R., and D. Baltimore. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46: 705-716.
268. Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260.
269. Nelson, D. E., A. E. Ihekweaba, M. Elliott, J. R. Johnson, C. A. Gibney, B. E. Foreman, G. Nelson, V. See, C. A. Horton, D. G. Spiller, S. W. Edwards, H. P. McDowell, J. F. Unitt, E. Sullivan, R. Grimley, N. Benson, D. Broomhead, D. B. Kell, and M. R. White. 2004. Oscillations in NF-kappaB signaling control the dynamics of gene expression. *Science* 306: 704-708.
270. Pahl, H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-6866.
271. Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18: 2195-2224.
272. Hiscott, J., H. Kwon, and P. Genin. 2001. Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest* 107: 143-151.
273. Nabel, G., and D. Baltimore. 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326: 711-713.
274. Zhong, H., M. J. May, E. Jimi, and S. Ghosh. 2002. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol Cell* 9: 625-636.
275. Perrino, F. W., D. J. Mazur, H. Ward, and S. Harvey. 1999. Exonucleases and the incorporation of arnucleotides into DNA. *Cell Biochem Biophys* 30: 331-352.
276. Mazur, D. J., and F. W. Perrino. 1999. Identification and expression of the TREX1 and TREX2 cDNA sequences encoding mammalian 3'-->5' exonucleases. *J Biol Chem* 274: 19655-19660.
277. Hoss, M., P. Robins, T. J. Naven, D. J. Pappin, J. Sgouros, and T. Lindahl. 1999. A human DNA editing enzyme homologous to the Escherichia coli DnaQ/MutD protein. *EMBO J* 18: 3868-3875.
278. Chowdhury, D., P. J. Beresford, P. Zhu, D. Zhang, J. S. Sung, B. Demple, F. W. Perrino, and J. Lieberman. 2006. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* 23: 133-142.
279. Stetson, D. B., J. S. Ko, T. Heidmann, and R. Medzhitov. 2008. Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity. *Cell* 134: 587-598.
280. Yan, N., A. D. Regalado-Magdos, B. Stiggelbout, M. A. Lee-Kirsch, and J. Lieberman. 2010. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat Immunol* 11: 1005-1013.
281. Wheeler, L. A., R. Trifonova, V. Vrbanac, E. Basar, S. McKernan, Z. Xu, E. Seung, M. Deruaz, T. Dudek, J. I. Einarsson, L. Yang, T. M. Allen, A. D. Luster, A. M. Tager, D. M. Dykxhoorn, and J. Lieberman. 2011. Inhibition of HIV transmission in human cervicovaginal explants and humanized mice using CD4 aptamer-siRNA chimeras. *J Clin Invest* 121: 2401-2412.
282. Geijtenbeek, T. B. 2010. Host DNase TREX1 hides HIV from DNA sensors. *Nat Immunol* 11: 979-980.
283. Simon, J. H., N. C. Gaddis, R. A. Fouchier, and M. H. Malim. 1998. Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype. *Nat Med* 4: 1397-1400.

284. Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim. 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral vif protein. *Nature* 418: 646-650.
285. Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim. 2003. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat Med* 9: 1404-1407.
286. Jarmuz, A., A. Chester, J. Bayliss, J. Gisbourne, I. Dunham, J. Scott, and N. Navaratnam. 2002. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79: 285-296.
287. Harris, R. S., K. N. Bishop, A. M. Sheehy, H. M. Craig, S. K. Petersen-Mahrt, I. N. Watt, M. S. Neuberger, and M. H. Malim. 2003. DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113: 803-809.
288. Bennett, R. P., V. Presnyak, J. E. Wedekind, and H. C. Smith. 2008. Nuclear Exclusion of the HIV-1 host defense factor APOBEC3G requires a novel cytoplasmic retention signal and is not dependent on RNA binding. *J Biol Chem* 283: 7320-7327.
289. Hofmann, W., D. Schubert, J. LaBonte, L. Munson, S. Gibson, J. Scammell, P. Ferrigno, and J. Sodroski. 1999. Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J Virol* 73: 10020-10028.
290. Kootstra, N. A., C. Munk, N. Tonnu, N. R. Landau, and I. M. Verma. 2003. Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1298-1303.
291. Munk, C., S. M. Brandt, G. Lucero, and N. R. Landau. 2002. A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13843-13848.
292. Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5 $\alpha$  restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427: 848-853.
293. Meroni, G., and G. Diez-Roux. 2005. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases. *Bioessays* 27: 1147-1157.
294. Sakuma, R., A. A. Mael, and Y. Ikeda. 2007. Alpha interferon enhances TRIM5 $\alpha$ -mediated antiviral activities in human and rhesus monkey cells. *J Virol* 81: 10201-10206.
295. Stremlau, M., M. Perron, M. Lee, Y. Li, B. Song, H. Javanbakht, F. Diaz-Griffero, D. J. Anderson, W. I. Sundquist, and J. Sodroski. 2006. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 $\alpha$  restriction factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5514-5519.
296. Tissot, C., and N. Mechti. 1995. Molecular cloning of a new interferon-induced factor that represses human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat expression. *J Biol Chem* 270: 14891-14898.
297. Kajaste-Rudnitski, A., S. S. Marelli, C. Pultrone, T. Pertel, P. D. Uchil, N. Mechti, W. Mothes, G. Poli, J. Luban, and E. Vicenzi. 2011. TRIM22 inhibits HIV-1 transcription independently of its E3 ubiquitin ligase activity, Tat, and NF-kappaB-responsive long terminal repeat elements. *J Virol* 85: 5183-5196.
298. Barr, S. D., J. R. Smiley, and F. D. Bushman. 2008. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS Pathog* 4: e1000007.
299. Asaoka, K., K. Ikeda, T. Hishinuma, K. Horie-Inoue, S. Takeda, and S. Inoue. 2005. A retrovirus restriction factor TRIM5 $\alpha$  is transcriptionally regulated by interferons. *Biochem Biophys Res Commun* 338: 1950-1956.
300. Tanaka, Y., H. Marusawa, H. Seno, Y. Matsumoto, Y. Ueda, Y. Kodama, Y. Endo, J. Yamauchi, T. Matsumoto, A. Takaori-Kondo, I. Ikai, and T. Chiba. 2006. Anti-viral protein APOBEC3G is induced by interferon-alpha stimulation in human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 314-319.
301. Kornbluth, R. S., P. S. Oh, J. R. Munis, P. H. Cleveland, and D. D. Richman. 1989. Interferons and bacterial lipopolysaccharide protect macrophages from productive infection by human immunodeficiency virus in vitro. *J Exp Med* 169: 1137-1151.
302. Poli, G., J. M. Orenstein, A. Kinter, T. M. Folks, and A. S. Fauci. 1989. Interferon-alpha but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. *Science* 244: 575-577.
303. Gottlinger, H. G., T. Dorfman, E. A. Cohen, and W. A. Haseltine. 1993. Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1 enhances the release of capsids produced by gag gene constructs of widely divergent retroviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7381-7385.
304. Klimkait, T., K. Strebel, M. D. Hoggan, M. A. Martin, and J. M. Orenstein. 1990. The human immunodeficiency virus type 1-specific protein vpu is required for efficient virus maturation and release. *J Virol* 64: 621-629.
305. Neil, S. J., S. W. Eastman, N. Jouvenet, and P. D. Bieniasz. 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog* 2: e39.

306. Neil, S. J., V. Sandrin, W. I. Sundquist, and P. D. Bieniasz. 2007. An interferon-alpha-induced tethering mechanism inhibits HIV-1 and Ebola virus particle release but is counteracted by the HIV-1 Vpu protein. *Cell Host Microbe* 2: 193-203.
307. Neil, S. J., T. Zang, and P. D. Bieniasz. 2008. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* 451: 425-430.
308. Van Damme, N., D. Goff, C. Katsura, R. L. Jorgenson, R. Mitchell, M. C. Johnson, E. B. Stephens, and J. Guatelli. 2008. The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* 3: 245-252.
309. Mangeat, B., G. Gers-Huber, M. Lehmann, M. Zufferey, J. Luban, and V. Piguet. 2009. HIV-1 Vpu neutralizes the antiviral factor Tetherin/BST-2 by binding it and directing its beta-TrCP2-dependent degradation. *PLoS Pathog* 5: e1000574.
310. Dube, M., B. B. Roy, P. Guiot-Guillain, J. Binette, J. Mercier, A. Chiasson, and E. A. Cohen. 2010. Antagonism of tetherin restriction of HIV-1 release by Vpu involves binding and sequestration of the restriction factor in a perinuclear compartment. *PLoS Pathog* 6: e1000856.
311. Negre, D., P. E. Mangeot, G. Duisit, S. Blanchard, P. O. Vidalain, P. Leissner, A. J. Winter, C. Roubourdin-Combe, M. Mehtali, P. Moullier, J. L. Darlix, and F. L. Cosset. 2000. Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* 7: 1613-1623.
312. Kaushik, R., X. Zhu, R. Stranska, Y. Wu, and M. Stevenson. 2009. A cellular restriction dictates the permissivity of nondividing monocytes/macrophages to lentivirus and gammaretrovirus infection. *Cell Host Microbe* 6: 68-80.
313. Kawamura, M., H. Sakai, and A. Adachi. 1994. Human immunodeficiency virus Vpx is required for the early phase of replication in peripheral blood mononuclear cells. *Microbiol Immunol* 38: 871-878.
314. Laguette, N., B. Sobhian, N. Casartelli, M. Ringard, C. Chable-Bessia, E. Segéral, A. Yatim, S. Emiliani, O. Schwartz, and M. Benkirane. 2011. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature* 474: 654-657.
315. Hrecka, K., C. Hao, M. Gierszewska, S. K. Swanson, M. Kesik-Brodacka, S. Srivastava, L. Florens, M. P. Washburn, and J. Skowronski. 2011. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature* 474: 658-661.
316. Goldstone, D. C., V. Ennis-Adeniran, J. J. Hedden, H. C. Groom, G. I. Rice, E. Christodoulou, P. A. Walker, G. Kelly, L. F. Haire, M. W. Yap, L. P. de Carvalho, J. P. Stoye, Y. J. Crow, I. A. Taylor, and M. Webb. 2011. HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase. *Nature* 480: 379-382.
317. Lahouassa, H., W. Daddacha, H. Hofmann, D. Ayinde, E. C. Logue, L. Dragin, N. Bloch, C. Maudet, M. Bertrand, T. Gramberg, G. Pancino, S. Priet, B. Canard, N. Laguette, M. Benkirane, C. Transy, N. R. Landau, B. Kim, and F. Margottin-Goguet. 2012. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nat Immunol* 13: 223-228.
318. Gorry, P. R., and P. Ancuta. 2011. Coreceptors and HIV-1 pathogenesis. *Curr HIV/AIDS Rep* 8: 45-53.
319. Boulassel, M. R., G. Spurril, D. Rouleau, C. Tremblay, M. Edwardes, R. P. Sekaly, R. Lalonde, and J. P. Routy. 2003. Changes in immunological and virological parameters in HIV-1 infected subjects following leukapheresis. *J Clin Apher* 18: 55-60.
320. Invitrogen™. 2009. Molecular Probes® LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kits. L. T. Inc., ed, Burlington, Ontario, Canada.
321. Staal, F. J., M. van der Burg, L. F. Wessels, B. H. Barendregt, M. R. Baert, C. M. van den Burg, C. van Huffel, A. W. Langerak, V. H. van der Velden, M. J. Reinders, and J. J. van Dongen. 2003. DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia* 17: 1324-1332.
322. McGill University and Génome Québec Innovation Centre. 2012. Affymetrix® Technology. Montréal, Québec, Canada.
323. Gentleman, R. C., V. J. Carey, D. M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A. J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J. Y. Yang, and J. Zhang. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5: R80.
324. R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.



325. Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, and T. P. Speed. 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 4: 249-264.
326. Hackstadt, A. J., and A. M. Hess. 2009. Filtering for increased power for microarray data analysis. *BMC Bioinformatics* 10: 11.
327. Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*: 289-300.
328. Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander, and J. P. Mesirov. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15545-15550.
329. Xie, X., J. Lu, E. J. Kulbokas, T. R. Golub, V. Mootha, K. Lindblad-Toh, E. S. Lander, and M. Kellis. 2005. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 434: 338-345.
330. Lehmann, J. M., L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, W. O. Wilkison, T. M. Willson, and S. A. Kliewer. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270: 12953-12956.
331. Lee, G., F. Elwood, J. McNally, J. Weiszmann, M. Lindstrom, K. Amaral, M. Nakamura, S. Miao, P. Cao, R. M. Learned, J. L. Chen, and Y. Li. 2002. T0070907, a selective ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma, functions as an antagonist of biochemical and cellular activities. *J Biol Chem* 277: 19649-19657.
332. Mimura, J., and Y. Fujii-Kuriyama. 2003. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619: 263-268.
333. Wincent, E., N. Amini, S. Luecke, H. Glatt, J. Bergman, C. Crescenzi, A. Rannug, and U. Rannug. 2009. The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem* 284: 2690-2696.
334. Monteiro, P., D. Gilot, E. Le Ferrec, C. Rauch, D. Lagadic-Gossmann, and O. Fardel. 2008. Dioxin-mediated up-regulation of aryl hydrocarbon receptor target genes is dependent on the calcium/calmodulin/CaMKIIalpha pathway. *Mol Pharmacol* 73: 769-777.
335. Jacobsen, L. B., S. A. Calvin, K. E. Colvin, and M. Wright. 2004. FuGENE 6 Transfection Reagent: the gentle power. *Methods* 33: 104-112.
336. Brussel, A., and P. Sonigo. 2003. Analysis of early human immunodeficiency virus type 1 DNA synthesis by use of a new sensitive assay for quantifying integrated provirus. *J Virol* 77: 10119-10124.
337. Poitras, and Houde. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2: 2-11.
338. Jackson, A. L., J. Burchard, D. Leake, A. Reynolds, J. Schelter, J. Guo, J. M. Johnson, L. Lim, J. Karpilow, K. Nichols, W. Marshall, A. Khvorova, and P. S. Linsley. 2006. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 12: 1197-1205.
339. Jaskiewicz, L., and W. Filipowicz. 2008. Role of Dicer in posttranscriptional RNA silencing. *Curr Top Microbiol Immunol* 320: 77-97.
340. Laroche, C., R. Cayrol, H. Kebir, J. I. Alvarez, M. A. Lecuyer, I. Ifergan, E. Viel, L. Bourbonniere, D. Beauseigle, S. Terouz, L. Hachehouche, S. Gendron, J. Poirier, C. Jobin, P. Duquette, K. Flanagan, T. Yednock, N. Arbour, and A. Prat. 2012. Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain : a journal of neurology* 135: 2906-2924.
341. Malpass, K. 2012. Disease mechanisms in MS: Cell adhesion molecule MCAM on pathogenic T cells-a green light for CNS entry in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*.
342. Boulton, I. C., and S. D. Gray-Owen. 2002. Neisserial binding to CEACAM1 arrests the activation and proliferation of CD4+ T lymphocytes. *Nat Immunol* 3: 229-236.
343. Sallusto, F., D. Impellizzieri, C. Basso, A. Laroni, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, and B. Engelhardt. 2012. T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol Rev* 248: 216-227.
344. Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms. 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85: 1149-1158.
345. Sato, W., T. Aranami, and T. Yamamura. 2007. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5- phenotype. *J Immunol* 178: 7525-7529.

346. Ben-Sasson, S. Z., J. Hu-Li, J. Quiel, S. Cauchetaux, M. Ratner, I. Shapira, C. A. Dinarello, and W. E. Paul. 2009. IL-1 acts directly on CD4 T cells to enhance their antigen-driven expansion and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 7119-7124.
347. Cayrol, R., K. Wosik, J. L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A. S. Haqqani, K. Kreymborg, S. Krug, R. Moumdjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic, and A. Prat. 2008. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 9: 137-145.
348. Ivey, N. S., N. A. Renner, T. Moroney-Rasmussen, M. Mohan, R. K. Redmann, P. J. Didier, X. Alvarez, A. A. Lackner, and A. G. MacLean. 2009. Association of FAK activation with lentivirus-induced disruption of blood-brain barrier tight junction-associated ZO-1 protein organization. *Journal of neurovirology* 15: 312-323.
349. Morita, R., N. Schmitt, S. E. Bentebibel, R. Ranganathan, L. Bourdery, G. Zurawski, E. Foucat, M. Dullaers, S. Oh, N. Sabzghabaei, E. M. Lavecchio, M. Punaro, V. Pascual, J. Banchereau, and H. Ueno. 2011. Human blood CXCR5(+)CD4(+) T cells are counterparts of T follicular cells and contain specific subsets that differentially support antibody secretion. *Immunity* 34: 108-121.
350. Cagigi, A., F. Mowafi, L. V. Phuong Dang, K. Tenner-Racz, A. Atlas, S. Grutzmeier, P. Racz, F. Chiodi, and A. Nilsson. 2008. Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection. *Blood* 112: 4401-4410.
351. Imai, T., M. Baba, M. Nishimura, M. Kakizaki, S. Takagi, and O. Yoshie. 1997. The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 272: 15036-15042.
352. Booth, V., D. W. Keizer, M. B. Kamphuis, I. Clark-Lewis, and B. D. Sykes. 2002. The CXCR3 binding chemokine IP-10/CXCL10: structure and receptor interactions. *Biochemistry* 41: 10418-10425.
353. Kim, B. O., Y. Liu, B. Y. Zhou, and J. J. He. 2004. Induction of C chemokine XCL1 (lymphotactin/single C motif-1 alpha/activation-induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine) expression by HIV-1 Tat protein. *J Immunol* 172: 1888-1895.
354. Egan, C. E., M. D. Craven, J. Leng, M. Mack, K. W. Simpson, and E. Y. Denkers. 2009. CCR2-dependent intraepithelial lymphocytes mediate inflammatory gut pathology during *Toxoplasma gondii* infection. *Mucosal Immunol* 2: 527-535.
355. Grewal, I. S., and R. A. Flavell. 1996. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 153: 85-106.
356. Muthumani, K., A. Y. Choo, D. S. Hwang, A. Premkumar, N. S. Dayes, C. Harris, D. R. Green, S. A. Wadsworth, J. J. Siekierka, and D. B. Weiner. 2005. HIV-1 Nef-induced FasL induction and bystander killing requires p38 MAPK activation. *Blood* 106: 2059-2068.
357. Lockyer, H. M., E. Tran, and B. H. Nelson. 2007. STAT5 is essential for Akt/p70S6 kinase activity during IL-2-induced lymphocyte proliferation. *J Immunol* 179: 5301-5308.
358. Croce, M., A. M. Orenco, B. Azzarone, and S. Ferrini. 2012. Immunotherapeutic applications of IL-15. *Immunotherapy* 4: 957-969.
359. Welch, J. S., M. Ricote, T. E. Akiyama, F. J. Gonzalez, and C. K. Glass. 2003. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6712-6717.
360. O'Garra, A., B. Stockinger, and M. Veldhoen. 2008. Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta! *Nat Immunol* 9: 588-590.
361. Ichikawa, M., T. Asai, S. Chiba, M. Kurokawa, and S. Ogawa. 2004. Runx1/AML-1 ranks as a master regulator of adult hematopoiesis. *Cell cycle* 3: 722-724.
362. Klotz, L., S. Burgdorf, I. Dani, K. Saijo, J. Flossdorf, S. Hucke, J. Alferink, N. Nowak, M. Beyer, G. Mayer, B. Langhans, T. Klockgether, A. Waisman, G. Eberl, J. Schultze, M. Famulok, W. Kolanus, C. Glass, C. Kurts, and P. A. Knolle. 2009. The nuclear receptor PPAR gamma selectively inhibits Th17 differentiation in a T cell-intrinsic fashion and suppresses CNS autoimmunity. *J Exp Med* 206: 2079-2089.
363. Chuang, H. C., J. M. Wang, W. C. Hsieh, Y. Chang, and I. J. Su. 2008. Up-regulation of activating transcription factor-5 suppresses SAP expression to activate T cells in hemophagocytic syndrome associated with Epstein-Barr virus infection and immune disorders. *The American journal of pathology* 173: 1397-1405.
364. Darlington, T. K., K. Wager-Smith, M. F. Ceriani, D. Staknis, N. Gekakis, T. D. Steeves, C. J. Weitz, J. S. Takahashi, and S. A. Kay. 1998. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science* 280: 1599-1603.

365. Yagi, R., J. Zhu, and W. E. Paul. 2011. An updated view on transcription factor GATA3-mediated regulation of Th1 and Th2 cell differentiation. *International immunology* 23: 415-420.
366. Ryan, R. F., D. C. Schultz, K. Ayyanathan, P. B. Singh, J. R. Friedman, W. J. Fredericks, and F. J. Rauscher, 3rd. 1999. KAP-1 corepressor protein interacts and colocalizes with heterochromatic and euchromatic HP1 proteins: a potential role for Kruppel-associated box-zinc finger proteins in heterochromatin-mediated gene silencing. *Molecular and cellular biology* 19: 4366-4378.
367. Li, X. A., K. Kokame, K. Okubo, K. Shimokado, Y. Tsukamoto, T. Miyata, H. Kato, and C. Yutani. 1999. Cloning and characterization of a novel human gene encoding a zinc finger protein with 25 fingers. *Biochim Biophys Acta* 1489: 405-412.
368. Cheng, Y., H. Geng, S. H. Cheng, P. Liang, Y. Bai, J. Li, G. Srivastava, M. H. Ng, T. Fukagawa, X. Wu, A. T. Chan, and Q. Tao. 2010. KRAB zinc finger protein ZNF382 is a proapoptotic tumor suppressor that represses multiple oncogenes and is commonly silenced in multiple carcinomas. *Cancer research* 70: 6516-6526.
369. Katoh, O., T. Oguri, T. Takahashi, S. Takai, Y. Fujiwara, and H. Watanabe. 1998. ZK1, a novel Kruppel-type zinc finger gene, is induced following exposure to ionizing radiation and enhances apoptotic cell death on hematopoietic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249: 595-600.
370. Huang, Y. H., K. H. Lin, C. H. Liao, M. W. Lai, Y. H. Tseng, and C. T. Yeh. 2012. Furin overexpression suppresses tumor growth and predicts a better postoperative disease-free survival in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 7: e40738.
371. Zou, S., N. El-Hage, E. M. Podhaizer, P. E. Knapp, and K. F. Hauser. 2011. PTEN gene silencing prevents HIV-1 gp120(IIIB)-induced degeneration of striatal neurons. *Journal of neurovirology* 17: 41-49.
372. Kim, N., S. Kukkonen, S. Gupta, and A. Aldovini. 2010. Association of Tat with promoters of PTEN and PP2A subunits is key to transcriptional activation of apoptotic pathways in HIV-infected CD4+ T cells. *PLoS Pathog* 6: e1001103.
373. Holzinger, I., A. de Baey, G. Messer, G. Kick, H. Zwierzina, and E. H. Weiss. 1995. Cloning and genomic characterization of LST1: a new gene in the human TNF region. *Immunogenetics* 42: 315-322.
374. de Beaucoudrey, L., A. Puel, O. Filipe-Santos, A. Cobat, P. Ghandil, M. Chrabieh, J. Feinberg, H. von Bernuth, A. Samarina, L. Janniere, C. Fieschi, J. L. Stephan, C. Boileau, S. Lyonnet, G. Jondeau, V. Cormier-Daire, M. Le Merrer, C. Hoarau, Y. Lebranchu, O. Lortholary, M. O. Chandesris, F. Tron, E. Gambineri, L. Bianchi, C. Rodriguez-Gallego, S. E. Zitnik, J. Vasconcelos, M. Guedes, A. B. Vitor, L. Marodi, H. Chapel, B. Reid, C. Roifman, D. Nadal, J. Reichenbach, I. Caragol, B. Z. Garty, F. Dogu, Y. Camcioglu, S. Gulle, O. Sanal, A. Fischer, L. Abel, B. Stockinger, C. Picard, and J. L. Casanova. 2008. Mutations in STAT3 and IL12RB1 impair the development of human IL-17-producing T cells. *J Exp Med* 205: 1543-1550.
375. Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter, and B. Becher. 2011. RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12: 560-567.
376. Birts, C. N., L. M. Bergman, and J. P. Blaydes. 2011. CtBPs promote mitotic fidelity through their activities in the cell nucleus. *Oncogene* 30: 1272-1280.
377. Macias-Silva, M., S. Abdollah, P. A. Hoodless, R. Pirone, L. Attisano, and J. L. Wrana. 1996. MADR2 is a substrate of the TGFbeta receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling. *Cell* 87: 1215-1224.
378. Bahmanyar, S., D. D. Kaplan, J. G. Deluca, T. H. Giddings, Jr., E. T. O'Toole, M. Winey, E. D. Salmon, P. J. Casey, W. J. Nelson, and A. I. Barth. 2008. beta-Catenin is a Nek2 substrate involved in centrosome separation. *Genes Dev* 22: 91-105.
379. Huang, W., L. Bei, and E. A. Eklund. 2012. Fas-associated phosphatase 1 mediates Fas resistance in myeloid progenitor cells expressing the Bcr-abl oncogene. *Leukemia & lymphoma*.
380. Lawson, C., S. T. Lim, S. Uryu, X. L. Chen, D. A. Calderwood, and D. D. Schlaepfer. 2012. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J Cell Biol* 196: 223-232.
381. Baumann, K. 2012. Cell adhesion: FAK or talin: who goes first? *Nature reviews. Molecular cell biology* 13: 138.
382. Trotman, L. C., X. Wang, A. Alimonti, Z. Chen, J. Teruya-Feldstein, H. Yang, N. P. Pavletich, B. S. Carver, C. Cordon-Cardo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, S. G. Chi, H. J. Kim, T. Misteli, X. Jiang, and P. P. Pandolfi. 2007. Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128: 141-156.
383. MacKenzie, S. H., and A. C. Clark. 2012. Death by caspase dimerization. *Advances in experimental medicine and biology* 747: 55-73.

384. Yamazaki, T., A. Ohmi, H. Kurumaya, K. Kato, T. Abe, H. Yamamoto, N. Nakanishi, R. Okuyama, M. Umemura, T. Kaise, R. Watanabe, Y. Okawa, S. Takahashi, and Y. Takahashi. 2010. Regulation of the human CHOP gene promoter by the stress response transcription factor ATF5 via the AARE1 site in human hepatoma HepG2 cells. *Life sciences* 87: 294-301.
385. Hildebrandt, T., J. Preiherr, N. Tarbe, S. Klostermann, G. N. Van Muijen, and U. H. Weidle. 2000. Identification of THW, a putative new tumor suppressor gene. *Anticancer research* 20: 2801-2809.
386. Takekawa, M., F. Posas, and H. Saito. 1997. A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J* 16: 4973-4982.
387. Luo, N., Y. Wu, Y. Chen, Z. Yang, S. Guo, L. Fei, D. Zhou, C. Yang, S. Wu, B. Ni, F. Hao, and Y. Wu. 2009. Upregulated BclG(L) expression enhances apoptosis of peripheral blood CD4+ T lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology* 132: 349-361.
388. Deiss, L. P., E. Feinstein, H. Berissi, O. Cohen, and A. Kimchi. 1995. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the gamma interferon-induced cell death. *Genes Dev* 9: 15-30.
389. Brugnano, J. L., B. K. Chan, B. L. Seal, and A. Panitch. 2011. Cell-penetrating peptides can confer biological function: regulation of inflammatory cytokines in human monocytes by MK2 inhibitor peptides. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 155: 128-133.
390. Shirshov, S. V. 2011. Role of Epac proteins in mechanisms of cAMP-dependent immunoregulation. *Biochemistry. Biokhimiia* 76: 981-998.
391. Puca, R., L. Nardinocchi, D. Givol, and G. D'Orazi. 2010. Regulation of p53 activity by HIPK2: molecular mechanisms and therapeutic implications in human cancer cells. *Oncogene* 29: 4378-4387.
392. Sorriento, D., M. Ciccarelli, G. Santulli, A. Campanile, G. G. Altobelli, V. Cimini, G. Galasso, D. Astone, F. Piscione, L. Pastore, B. Trimarco, and G. Iaccarino. 2008. The G-protein-coupled receptor kinase 5 inhibits NF-kappaB transcriptional activity by inducing nuclear accumulation of IkappaB alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17818-17823.
393. Channavajhala, P. L., V. R. Rao, V. Spaulding, L. L. Lin, and Y. G. Zhang. 2005. hKSR-2 inhibits MEKK3-activated MAP kinase and NF-kappaB pathways in inflammation. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1214-1218.
394. Steers, N. J., S. Ratto-Kim, M. S. de Souza, J. R. Currier, J. H. Kim, N. L. Michael, C. R. Alving, and M. Rao. 2012. HIV-1 envelope resistance to proteasomal cleavage: implications for vaccine induced immune responses. *PLoS One* 7: e42579.
395. DeHart, J. L., E. S. Zimmerman, O. Ardon, C. M. Monteiro-Filho, E. R. Arganaraz, and V. Planelles. 2007. HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virol J* 4: 57.
396. Howe, A. K., A. E. Aplin, and R. L. Juliano. 2002. Anchorage-dependent ERK signaling--mechanisms and consequences. *Curr Opin Genet Dev* 12: 30-35.
397. Moll, U. M., N. Marchenko, and X. K. Zhang. 2006. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction. *Oncogene* 25: 4725-4743.
398. Barascu, A., C. Le Chalony, G. Pennarun, D. Genet, N. Imam, B. Lopez, and P. Bertrand. 2012. Oxidative stress induces an ATM-independent senescence pathway through p38 MAPK-mediated lamin B1 accumulation. *EMBO J* 31: 1080-1094.
399. Kwon, M. J., J. Ma, Y. Ding, R. Wang, and Z. Sun. 2012. Protein kinase C-theta promotes Th17 differentiation via upregulation of Stat3. *J Immunol* 188: 5887-5897.
400. Yamamoto, A., H. Kakuta, H. Miyachi, and Y. Sugimoto. 2011. Involvement of the Retinoid X Receptor Ligand in the Anti-Inflammatory Effect Induced by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma Agonist In Vivo. *PPAR Res* 2011: 840194.
401. Hor, S., H. Pirzer, L. Dumoutier, F. Bauer, S. Wittmann, H. Sticht, J. C. Renauld, R. de Waal Malefyt, and H. Fickenscher. 2004. The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains. *J Biol Chem* 279: 33343-33351.
402. Dambacher, J., F. Beigel, K. Zitzmann, E. N. De Toni, B. Goke, H. M. Diepolder, C. J. Auernhammer, and S. Brand. 2009. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* 58: 1207-1217.
403. Chan, L. S., and R. A. Wells. 2009. Cross-Talk between PPARs and the Partners of RXR: A Molecular Perspective. *PPAR Res* 2009: 925309.

404. Potula, R., S. H. Ramirez, B. Knipe, J. Leibhart, K. Schall, D. Heilman, B. Morsey, A. Mercer, A. Papugani, H. Dou, and Y. Persidsky. 2008. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation suppresses HIV-1 replication in an animal model of encephalitis. *Aids* 22: 1539-1549.
405. Wang, C., C. X. Xu, S. L. Krager, K. M. Bottum, D. F. Liao, and S. A. Tischkau. 2011. Aryl hydrocarbon receptor deficiency enhances insulin sensitivity and reduces PPAR-alpha pathway activity in mice. *Environ Health Perspect* 119: 1739-1744.
406. Veldhoen, M., K. Hirota, A. M. Westendorf, J. Buer, L. Dumoutier, J. C. Renauld, and B. Stockinger. 2008. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 453: 106-109.
407. Umemoto, T., and Y. Fujiki. 2012. Ligand-dependent nucleo-cytoplasmic shuttling of peroxisome proliferator-activated receptors, PPARalpha and PPARgamma. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 17: 576-596.
408. Schmidt, M. V., B. Brune, and A. von Knethen. 2010. The nuclear hormone receptor PPARgamma as a therapeutic target in major diseases. *TheScientificWorldJournal* 10: 2181-2197.
409. Augstein, P., A. Dunger, P. Heinke, G. Wachlin, S. Berg, B. Hehmke, and E. Salzsieder. 2003. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by troglitazone is associated with modulation of ICAM-1 expression on pancreatic islet cells and IFN-gamma expression in splenic T cells. *Biochem Biophys Res Commun* 304: 378-384.
410. Rudnicka, W., N. English, J. Farrant, M. E. North, A. E. Bryant, A. J. Edwards, A. Stackpoole, A. D. Webster, and B. M. Balfour. 1992. LFA-1-dependent OKT3-driven T cell clusters in common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 87: 46-52.
411. Clark, R. B., D. Bishop-Bailey, T. Estrada-Hernandez, T. Hla, L. Puddington, and S. J. Padula. 2000. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* 164: 1364-1371.
412. Catalfamo, M., C. Le Saout, and H. C. Lane. 2012. The role of cytokines in the pathogenesis and treatment of HIV infection. *Cytokine & growth factor reviews* 23: 207-214.
413. Ohtake, F., A. Baba, I. Takada, M. Okada, K. Iwasaki, H. Miki, S. Takahashi, A. Kouzmenko, K. Nohara, T. Chiba, Y. Fujii-Kuriyama, and S. Kato. 2007. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 562-566.
414. Lebovitz, H. E., J. F. Dole, R. Patwardhan, E. B. Rappaport, M. I. Freed, and G. Rosiglitazone Clinical Trials Study. 2001. Rosiglitazone monotherapy is effective in patients with type 2 diabetes. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86: 280-288.
415. Macallan, D. C., C. Baldwin, S. Mandalia, V. Pandol-Kaljevic, N. Higgins, A. Grundy, and G. J. Moyle. 2008. Treatment of altered body composition in HIV-associated lipodystrophy: comparison of rosiglitazone, pravastatin, and recombinant human growth hormone. *HIV clinical trials* 9: 254-268.
416. Qu, X., R. P. Metz, W. W. Porter, V. M. Cassone, and D. J. Earnest. 2007. Disruption of clock gene expression alters responses of the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway in the mouse mammary gland. *Mol Pharmacol* 72: 1349-1358.
417. Shimba, S., and Y. Watabe. 2009. Crosstalk between the AHR signaling pathway and circadian rhythm. *Biochemical pharmacology* 77: 560-565.
418. Richardson, V. M., M. J. Santostefano, and L. S. Birnbaum. 1998. Daily cycle of bHLH-PAS proteins, Ah receptor and Arnt, in multiple tissues of female Sprague-Dawley rats. *Biochem Biophys Res Commun* 252: 225-231.
419. Gharu, L., R. Ringe, A. Satyakumar, A. Patil, and J. Bhattacharya. 2011. Short communication: evidence of HIV type 1 clade C env clones containing low V3 loop charge obtained from an AIDS patient in India that uses CXCR6 and CCR8 for entry in addition to CCR5. *AIDS research and human retroviruses* 27: 211-219.
420. Pohlmann, S., B. Lee, S. Meister, M. Krumbiegel, G. Leslie, R. W. Doms, and F. Kirchhoff. 2000. Simian immunodeficiency virus utilizes human and sooty mangabey but not rhesus macaque STRL33 for efficient entry. *J Virol* 74: 5075-5082.
421. Edinger, A. L., T. L. Hoffman, M. Sharron, B. Lee, B. O'Dowd, and R. W. Doms. 1998. Use of GPR1, GPR15, and STRL33 as coreceptors by diverse human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus envelope proteins. *Virology* 249: 367-378.
422. Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greaves, A. Zlotnik, and T. J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385: 640-644.

423. Van Belle, T. L., H. Dooms, T. Boonefaes, X. Q. Wei, G. Leclercq, and J. Grooten. 2012. IL-15 Augments TCR-Induced CD4(+) T Cell Expansion In Vitro by Inhibiting the Suppressive Function of CD25(High) CD4(+) T Cells. *PLoS One* 7: e45299.
424. Kassiotis, G., and B. Stockinger. 2004. Anatomical heterogeneity of memory CD4+ T cells due to reversible adaptation to the microenvironment. *J Immunol* 173: 7292-7298.
425. Semple, B. D., T. Kossmann, and M. C. Morganti-Kossmann. 2010. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30: 459-473.
426. Kelder, W., J. C. McArthur, T. Nance-Sproson, D. McClernon, and D. E. Griffin. 1998. Beta-chemokines MCP-1 and RANTES are selectively increased in cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated dementia. *Annals of neurology* 44: 831-835.
427. Lee, E. O., S. E. Kim, H. K. Park, J. L. Kang, and Y. H. Chong. 2011. Extracellular HIV-1 Tat upregulates TNF-alpha dependent MCP-1/CCL2 production via activation of ERK1/2 pathway in rat hippocampal slice cultures: inhibition by resveratrol, a polyphenolic phytoestrogen. *Experimental neurology* 229: 399-408.
428. Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt, and F. Sallusto. 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 10: 514-523.
429. Fontaine, J., J. Poudrier, and M. Roger. 2011. Short communication: persistence of high blood levels of the chemokines CCL2, CCL19, and CCL20 during the course of HIV infection. *AIDS research and human retroviruses* 27: 655-657.
430. Kebir, H., I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, and A. Prat. 2009. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 66: 390-402.
431. Lee, H. S., M. A. Ostrowski, and S. D. Gray-Owen. 2008. CEACAM1 dynamics during neisseria gonorrhoeae suppression of CD4+ T lymphocyte activation. *J Immunol* 180: 6827-6835.
432. Feily, A., and M. R. Namazi. 2010. Increasing HIV infectivity by Neisseria gonorrhea: role of host antiapoptotic proteins in enhanced transmission. *AIDS* 24: 1237.
433. Spiegelman, B. M. 1998. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47: 507-514.
434. Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 2005. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437: 759-763.
435. Mayerson, A. B., R. S. Hundal, S. Dufour, V. Lebon, D. Befroy, G. W. Cline, S. Enoksson, S. E. Inzucchi, G. I. Shulman, and K. F. Petersen. 2002. The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 797-802.
436. van Wijk, J. P., E. J. de Koning, M. C. Cabezas, J. op't Roodt, J. Joven, T. J. Rabelink, and A. I. Hoepelman. 2005. Comparison of rosiglitazone and metformin for treating HIV lipodystrophy: a randomized trial. *Annals of internal medicine* 143: 337-346.
437. Boisvert, M., S. Cote, A. Vargas, S. Pasvanis, S. Bounou, B. Barbeau, and N. Dumais. 2008. PGJ2 antagonizes NF-kappaB-induced HIV-1 LTR activation in colonic epithelial cells. *Virology* 380: 1-11.
438. Skolnik, P. R., M. F. Rabbi, J. M. Mathys, and A. S. Greenberg. 2002. Stimulation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma blocks HIV-1 replication and TNFalpha production in acutely infected primary blood cells, chronically infected U1 cells, and alveolar macrophages from HIV-infected subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* 31: 1-10.
439. Johnson, E. S. 2004. Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73: 355-382.
440. Chawla, A., W. A. Boisvert, C. H. Lee, B. A. Laffitte, Y. Barak, S. B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P. A. Edwards, L. K. Curtiss, R. M. Evans, and P. Tontonoz. 2001. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7: 161-171.
441. Hanley, T. M., W. Blay Puryear, S. Gummuluru, and G. A. Vighianti. 2010. PPARgamma and LXR signaling inhibit dendritic cell-mediated HIV-1 capture and trans-infection. *PLoS Pathog* 6: e1000981.
442. Foster, J. L., and J. V. Garcia. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5: 84.
443. Otake, K., S. Omoto, T. Yamamoto, H. Okuyama, H. Okada, N. Okada, M. Kawai, N. K. Saxena, and Y. R. Fujii. 2004. HIV-1 Nef protein in the nucleus influences adipogenesis as well as viral transcription through the peroxisome proliferator-activated receptors. *AIDS* 18: 189-198.

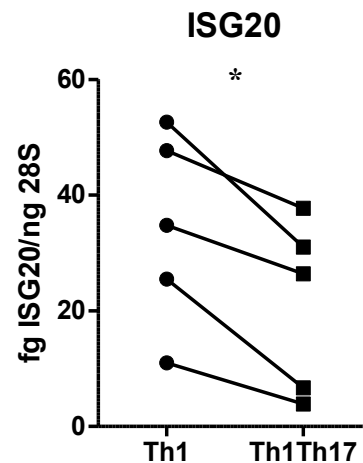
444. Prost, S., M. Le Dantec, S. Auge, R. Le Grand, S. Derdouch, G. Auregan, N. Deglon, F. Relouzat, A. M. Aubertin, B. Maillere, I. Dusanter-Fourt, and M. Kirszenbaum. 2008. Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques. *J Clin Invest* 118: 1765-1775.
445. Unutmaz, D., V. N. KewalRamani, S. Marmon, and D. R. Littman. 1999. Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med* 189: 1735-1746.
446. Nissen, S. E., and K. Wolski. 2007. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 356: 2457-2471.
447. Kong, A. P., A. Yamasaki, R. Ozaki, H. Saito, T. Asami, S. Ohwada, G. T. Ko, C. K. Wong, G. T. Leung, K. F. Lee, C. Y. Yeung, and J. C. Chan. 2011. A randomized-controlled trial to investigate the effects of rivoglitazone, a novel PPAR gamma agonist on glucose-lipid control in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 13: 806-813.
448. Kliewer, S. A., J. M. Lenhard, T. M. Willson, I. Patel, D. C. Morris, and J. M. Lehmann. 1995. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83: 813-819.
449. Hogenesch, J. B., W. K. Chan, V. H. Jackiw, R. C. Brown, Y. Z. Gu, M. Pray-Grant, G. H. Perdew, and C. A. Bradfield. 1997. Characterization of a subset of the basic-helix-loop-helix-PAS superfamily that interacts with components of the dioxin signaling pathway. *J Biol Chem* 272: 8581-8593.
450. Etchegaray, J. P., C. Lee, P. A. Wade, and S. M. Reppert. 2003. Rhythmic histone acetylation underlies transcription in the mammalian circadian clock. *Nature* 421: 177-182.
451. Xu, C. X., S. L. Krager, D. F. Liao, and S. A. Tischkau. 2010. Disruption of CLOCK-BMAL1 transcriptional activity is responsible for aryl hydrocarbon receptor-mediated regulation of Period1 gene. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 115: 98-108.
452. Richter, C. A., D. E. Tillitt, and M. Hannink. 2001. Regulation of subcellular localization of the aryl hydrocarbon receptor (AhR). *Archives of biochemistry and biophysics* 389: 207-217.
453. Denison, M. S., and S. R. Nagy. 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 309-334.
454. Brembilla, N. C., J. M. Ramirez, R. Chicheportiche, O. Sorg, J. H. Saurat, and C. Chizzolini. 2011. In vivo dioxin favors interleukin-22 production by human CD4+ T cells in an aryl hydrocarbon receptor (AhR)-dependent manner. *PLoS One* 6: e18741.
455. Votteler, J., and U. Schubert. 2008. Ubiquitin ligases as therapeutic targets in HIV-1 infection. *Expert Opin Ther Targets* 12: 131-143.
456. Quintana, F. J., A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka, and H. L. Weiner. 2008. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 453: 65-71.
457. Denison, M. S., A. A. Soshilov, G. He, D. E. DeGroot, and B. Zhao. 2011. Exactly the same but different: promiscuity and diversity in the molecular mechanisms of action of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124: 1-22.
458. Cespedes, M. A., M. I. Galindo, and J. P. Couso. 2010. Dioxin toxicity in vivo results from an increase in the dioxin-independent transcriptional activity of the aryl hydrocarbon receptor. *PLoS One* 5: e15382.
459. Vogel, C. F., E. Sciallo, W. Li, P. Wong, G. Lazennec, and F. Matsumura. 2007. RelB, a new partner of aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription. *Molecular endocrinology* 21: 2941-2955.
460. Monteiro, P., D. Gilot, E. Le Ferrec, V. Lecureur, M. N'Diaye, M. Le Vee, N. Podechard, C. Pouponnot, and O. Fardel. 2007. AhR- and c-maf-dependent induction of beta7-integrin expression in human macrophages in response to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 442-448.
461. Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu, and W. Ouyang. 2007. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 445: 648-651.
462. Maier, R., M. M. Bartolome-Rodriguez, C. Moulon, H. U. Weltzien, and A. Meyerhans. 2000. Kinetics of CXCR4 and CCR5 up-regulation and human immunodeficiency virus expansion after antigenic stimulation of primary CD4(+) T lymphocytes. *Blood* 96: 1853-1856.
463. Ohata, H., T. Tetsuka, H. Hayashi, K. Onozaki, and T. Okamoto. 2003. 3-methylcholanthrene activates human immunodeficiency virus type 1 replication via aryl hydrocarbon receptor. *Microbiol Immunol* 47: 363-370.



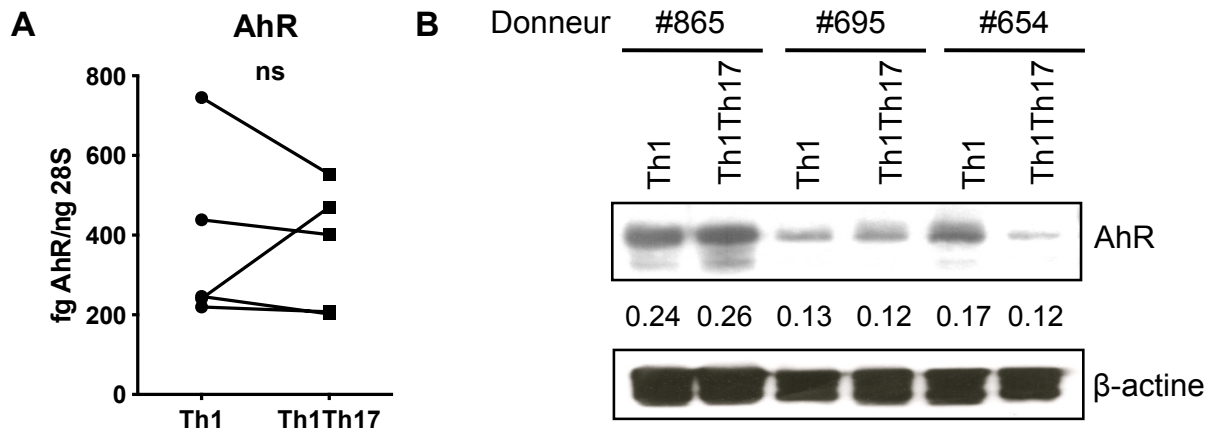


## 7. ANNEXE

### 7.1 Figures supplémentaires – Section 4.3



**Figure S1. Niveaux d'expression du gène ISG20 dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1.** Les cellules Th1Th17 et Th1 triées de donneurs non infectés par le VIH ont été stimulées via CD3/CD28 durant 3 jours. L'ARN total a été extrait avec une trousse d'extraction de Qiagen. Les RT-PCR quantitatives en temps réels ont été réalisées sur LightCycler 480 II (Roche) à l'aide de la trousse *QuantiTect SYBR Green RT PCR* et des amorces spécifiques (Qiagen). La quantification a été réalisée par rapport à une courbe standard générée avec de l'ADNc de chaque transcrit. L'expression relative de chacun des gènes a été normalisée par rapport aux niveaux d'ARN ribosomal 28S. Les résultats d'expression de l'ARNm de 5 donneurs différents et la valeur du test t de Student apparié est indiquée (\*  $p \leq 0.05$ ).



**Figure S2. Niveaux d'expression du gène AhR dans les cellules Th1Th17 versus Th1.** Les cellules Th1Th17 et Th1 triées de donneurs non infectés par le VIH ont été stimulées via CD3/CD28 durant 3 jours. A. L'ARN total a été extrait avec une trousse d'extraction de Qiagen. Les RT-PCR quantitatives en temps réels ont été réalisées sur LightCycler 480 II (Roche) à l'aide de la trousse *QuantiTect SYBR Green RT PCR* et des amorces spécifiques (Qiagen). La quantification a été réalisée par rapport à une courbe standard générée avec de l'ADNc de chaque transcrite. L'expression relative de chacun des gènes a été normalisée par rapport aux niveaux d'ARN ribosomal 28S. Les résultats d'expression de l'ARNm de 5 donneurs différents et la valeur du test t de Student apparié est indiquée (ns  $p > 0.05$ ). B. En parallèle, des cellules ont été lysées et la concentration des lysats en protéines a été déterminée par la méthode de Bradford. 40  $\mu$ g de protéines par puits ont été utilisés pour un immunobuvardage sur gel d'acrylamide. Après transfert sur membranes PVDF, celles-ci ont été exposées à un Acs anti-AhR. La révélation est faite par dosage de la chimioluminescence (ECL Plus, GE Healthcare) sur film photographique. L'expression de la  $\beta$ -actine est utilisée comme contrôle afin de calculer l'intensité relative à l'aide du logiciel GelEval v1.35, tel qu'indiqué sous chaque bande.

## 7.2 Liste des présentations et des prix de présentations

02/11/2012 Journée SIDA et Maladies Infectieuses du Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), « Mécanismes moléculaires de la réplication différentielle du VIH-1 dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 », Hôtel Méridien, Montréal, Qc, Canada; présentation par affiche (voir section 7.4 pour résumé et affiche)

*Prix de la meilleure présentation par affiche*

19/04/2012 CAHR 2012, Canadian Association for HIV Research, “Transcriptional Profiling in HIV Permissive *versus* Resistant CD4+ T-Cell Subsets Identified PPAR $\gamma$  as A Negative Regulator of HIV Replication in Th1Th17 cells”, 19-22 avril 2012, Hôtel Reine Elizabeth, Montréal, Qc, Canada; présentation par affiche

05/03/2012 CROI 2012, 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, "Transcriptional Profiling in HIV Permissive *versus* Resistant CD4+ T-Cell Subsets Identified PPAR $\gamma$  as A Negative Regulator of HIV Replication in Th1Th17 cells", 5-8 mars 2012, Washington State Convention Center, Seattle, WA, États-Unis; présentation orale en discussion thématique et présentation par affiche (voir section 7.3 pour résumé et affiche)

*Young Investigator Award, CROI 2012*

13/12/2011 14<sup>e</sup> congrès annuel des étudiants du CRCHUM, « Mécanismes moléculaires de la réplication différentielle du VIH-1 dans les cellules Th1Th17 *versus* Th1 », Hôpital Notre-Dame, Montréal, Qc, Canada; présentation par affiche

*Prix d'excellence de la présentation par affiche, catégorie maîtrise*

18/11/2011 Journée SIDA et Maladies Infectieuses du Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), « Mécanismes moléculaires de la réplication différentielle du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4+ Th1 *versus* Th1Th17 », Hôtel Méridien, Montréal, Qc, Canada; présentation orale

*Prix de la 2<sup>e</sup> meilleure présentation orale*

28/10/2011 Journée des étudiants du département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal, « Mécanismes moléculaires de la réplication différentielle du VIH-1 dans les lymphocytes T CD4+ Th1 *versus* Th1Th17 », 28 octobre 2011, Montréal, Qc, Canada; présentation orale

### 7.3 Résumé de présentation et affiche présentée à la 19<sup>e</sup> Conférence sur les rétrovirus et les infections opportunistes (CROI 2012), Seattle, WA, États-Unis

#### Transcriptional Profiling in HIV Permissive *versus* Resistant CD4+ T-Cell Subsets Identified PPAR $\gamma$ as A Negative Regulator of HIV Replication in Th1Th17 cells

Annie Bernier<sup>1, 2</sup>, Patricia Monteiro<sup>1,2</sup>, Jean-Philippe Goulet<sup>1,3</sup>, Annie Gosselin<sup>2</sup>, Rafick-Pierre Sekaly<sup>3</sup>, Elias Haddad<sup>3</sup>, and Petronela Ancuta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Université de Montréal, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Immunology; <sup>2</sup>CHUM-Research Center, Saint Luc Hospital, Montreal, Quebec, Canada; <sup>3</sup>Vaccine and Gene Therapy Institute, Port St Lucie, Florida, USA;

**Background:** We previously demonstrated that CXCR3+CCR6+ (Th1Th17) and CXCR3+CCR6- (Th1) T-cells are permissive and resistant to HIV, respectively, and that CD4 count restoration in HAART-treated patients is associated with an increased frequency of Th1 cells only. We used a systems biology approach to identify molecular mechanisms underlying differences in Th1 *versus* Th1Th17.

**Methods:** The Affymetrix technology (HG U133 Plus 2.0 Array) was used to identify gene sets differentially expressed in Th1 *versus* Th1Th17 cells from 4 uninfected donors. One-way ANOVA analysis identified differentially expressed genes (p-value<0.05). Gene expression was validated by SYBR Green real-time RT-PCR, FACS, and western blotting. Specific inhibitors and RNA interference were used to assess the role of identified transcripts in HIV regulation. ELISA and real-time PCR were used to quantify HIV replication and integration, respectively. Viability (Vivid) and proliferation assays (CFSE dilution) were performed in parallel.

**Results:** Among 38,114 present call, 780 probe sets were differentially expressed in Th1Th17 *versus* Th1 cells (p<0.05), with 265 and 235 genes being upregulated and downregulated, respectively (1.3 fold change cut-off). The upregulated genes included known Th17-specific transcripts (IL-17, IL-22, CCL20, RORC, RORA, IL-26, CCR6) and molecules involved in T-cell activation (TNFSF25, IL1R1, LST1, CCR2, CXCR6). PPARG (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), a known negative regulator of Th17 polarization, was upregulated in Th1Th17 *versus* Th1 cells. The activation of PPARG pathway using Rosiglitazone significantly decreased HIV replication and integration in Th1Th17 cells, without interfering with cell viability, proliferation, nor CD4 expression. RNA interference studies confirmed the role of PPARG in the negative regulation of HIV replication. Ongoing studies aim to localize the step in the viral replication cycle targeted by the PPARG pathway.

**Conclusion:** This is the first genome-wide characterization of gene expression in CD4+ T-cell subsets permissive (Th1Th17) *versus* resistant (Th1) to HIV infection. We identified the PPARG pathway as a negative regulator of HIV replication, likely by interfering with Th17 polarization in CD4+ T-cells. The functional validation of other potential regulators of HIV replication is in progress. These studies have the potential to suggest new therapeutic strategies to interfere with HIV replication in primary T-cells.

# Transcriptional Profiling in HIV Permissive Resistant CD4+ T-Cell Subsets Identified PPAR $\gamma$ as A Negative Regulator of HIV Replication

Université de Montréal

Annie Bernier<sup>1,2</sup>, Patricia Monteiro<sup>1,2</sup>, Jean-Philippe Goulet<sup>3,4,5</sup>, Annie Gosselin<sup>2</sup>, Rafick-Pierre Sekaly<sup>3,4,5</sup>, Elias Haddad<sup>3</sup>, and Petronela Ancuta<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Université de Montréal, Faculty of Medicine, Department of Microbiology and Immunology; <sup>2</sup>CHUM-Research Center, Saint Luc Hospital, Montreal, Quebec, Canada; <sup>3</sup>Vaccine and Gene Therapy Institute, Port St Lucie, Florida, USA; <sup>4</sup>CARiGENE, Université de Montréal; and <sup>5</sup>St-Justine Hospital Research Center, Université de Montréal, Quebec, Canada



## ABSTRACT

**Background:** We previously demonstrated that CXCR3-CCR6<sup>+</sup> (Th1Th17) and CXCR3-CCR6<sup>-</sup> (Th1) T-cells are permissive and resistant to HIV, respectively, and that CD4 count restoration in HAART-treated patients is associated with an increased frequency of Th1 cells only. We now used a systems biology approach to identify molecular mechanisms underlying differences between Th1 and Th1Th17 cells.

**Methods:** The Affymetrix technology (HG133Plus 2.0 Array) was used to identify gene sets differentially expressed in Th1 versus Th1Th17 cells from 4 uninfected donors. One-way ANOVA analysis identified differentially expressed genes (p-value<0.05). Gene expression was validated by SYBR Green real-time RT-PCR, FACS, and western blotting. Specific drugs and RNA interference were used to assess the role of identified transcripts in HIV regulation. ELISA and real-time PCR were used to quantify HIV replication and integration, respectively. Viability (Vivid) and proliferation assays (CFSE dilution) were performed in parallel.

**Results:** Among 38,114 present calls, 780 probe sets were differentially expressed in Th1Th17 versus Th1 cells (p<0.05), with 265 and 235 genes being upregulated and downregulated, respectively (1.3 fold change cut-off). The upregulated genes included known Th17-specific transcripts (IL-17, IL-22, CCL20, RORC, RORA, IL-26, CXCR5) and molecules involved in T-cell activation (TNFSF25, IL1R1, LST1, CCR2, CXCR6). PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), a known negative regulator of Th17 polarization, was upregulated in Th1Th17 versus Th1 cells. The activation of PPAR $\gamma$  pathway using Rosiglitazone significantly decreased HIV replication and integration in Th1Th17 cells, without interfering with cell viability, proliferation, or CD4 expression. RNA interference studies confirmed the role of PPAR $\gamma$  in the negative regulation of HIV replication. Ongoing studies aim to localize the step in the viral replication cycle targeted by the PPAR $\gamma$  pathway.

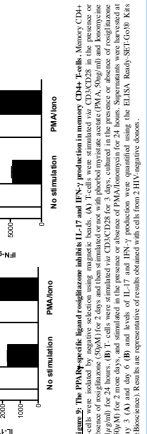
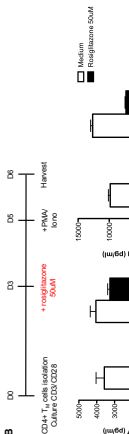
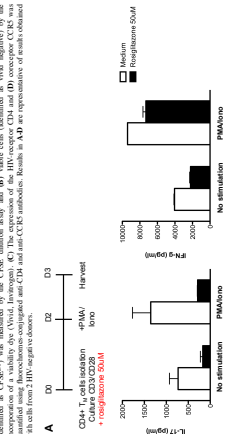
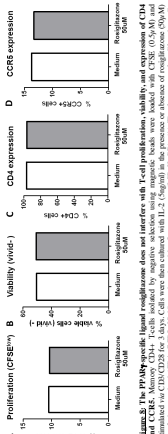
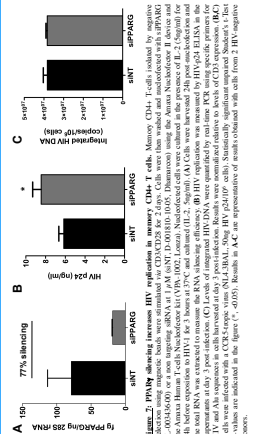
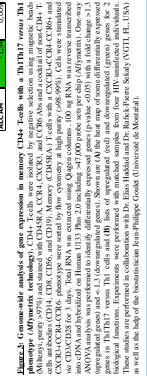
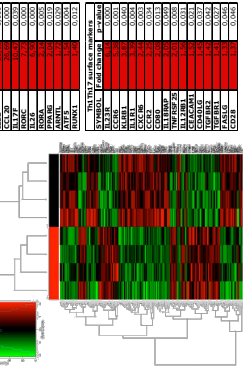
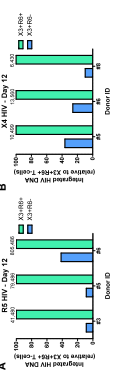
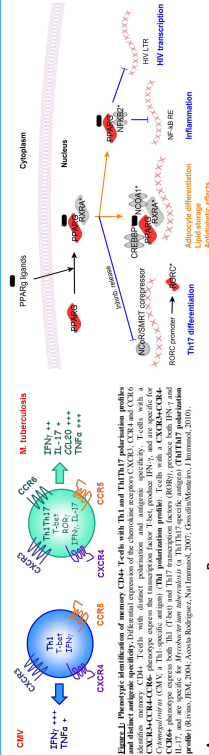
**Conclusion:** This is the first genome-wide characterization of gene expression in CD4<sup>+</sup> T-cell subsets permissive (Th1Th17) versus resistant (Th1) to HIV infection. We identified the PPAR $\gamma$  pathway as a negative regulator of HIV replication, likely by interfering with Th17 polarization in CD4<sup>+</sup> T-cells. The functional validation of other potential regulators of HIV replication is in progress. These studies have the potential to suggest new therapeutic strategies to interfere with HIV replication in primary T-cells.



IRSC CIHR



## RESULTS



#### 7.4 Résumé de présentation et affiche présentée à la Journée SIDA et Maladies Infectieuses du FRSQ, 2012, Montréal, Qc, Canada

##### Mécanismes moléculaires de la réplication différentielle du VIH-1 dans les cellules Th1 versus Th1Th17

Annie Bernier, Aurélie Cleret, Patricia Monteiro, Jean-Philippe Goulet et Petronela Ancuta

CRCHUM, Hôpital Saint-Luc, Université de Montréal, Canada.

**Introduction:** Notre laboratoire a démontré que les cellules Th1 à phénotype CXCR3+CCR6- sont relativement résistantes et que les cellules Th1Th17 à phénotype CXCR3+CCR6+ sont hautement permissives à l'infection par le VIH-1. La réplication du VIH dépend de facteurs cellulaires agissant à différentes étapes du cycle viral. Malgré plusieurs avancées, la compréhension des voies de signalisation cellulaire impliquées dans la réplication du VIH est encore limitée. Notre objectif est d'identifier les mécanismes moléculaires de la résistance *versus* la permissivité au VIH dans les cellules Th1 *vs* Th1Th17.

**Méthodes:** Des études avec des biopuces (technologie Affymetrix) ont été réalisées pour comparer le transcriptome des cellules Th1 *versus* Th1Th17 chez 4 donneurs non infectés par le VIH. Des analyses réalisées par *Gene Set Enrichment Analysis* et *Ingenuity Pathway Analysis* ont permis d'identifier des fonctions biologiques et des voies de signalisation différemment exprimées. L'expression différentielle des gènes d'intérêt a été confirmée par RT-PCR quantitative en temps réel et immunobuvardage. Différentes molécules permettant l'activation des gènes d'intérêt, tel un ligand de PPARg (rosiglitazone), ont été utilisés pour comparer les niveaux d'infection entre les cellules stimulées ou non par ces molécules. La réplication du VIH a été mesurée par quantification de l'ADN viral intégré par PCR en temps réel et mesure de la protéine p24 du VIH par ELISA.

**Résultats:** Des 38113 sondes détectées, 780 étaient différemment exprimés dans les Th1Th17 *vs* Th1 ( $p < 0.05$ ). Les analyses ont mis en évidence des différences d'expression de gènes jouant un rôle dans la migration endothéliale, l'inflammation, la différenciation des cellules T, l'apoptose et la dégradation protéasomale. Nous avons confirmé l'expression différentielle de certains gènes dans les cellules Th1 (e.g., SERPINB6, PTK2) *versus* Th1Th17 (e.g., CXCR6, PPARg). Finalement, nous avons démontré que l'activation de la voie PPARg induit la diminution de la réplication du VIH dans les cellules T CD4+.

**Conclusion:** Nous avons identifié des différences dans la régulation de diverses fonctions biologiques permettant en partie d'expliquer la susceptibilité à l'infection par le VIH dans les cellules T CD4+. Nous avons identifié la voie PPARg comme un régulateur négatif de la réplication du VIH, probablement en interférant avec la polarisation Th17. Ces études ont le potentiel de suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour interférer avec la réplication du VIH dans les lymphocytes T.

**RÉSUMÉ**

**Introduction:** Notre laboratoire a démontré que les cellules Th1 à phénotype CXCR3+CCR6 sont relativement résistantes et que les cellules Th17 à phénotype CXCR3+CCR6+ sont hautement permissives à l'infestation par le VIH-1. La réplication du VIH dépend de facteurs cellulaires agissant à différentes étapes du cycle viral. Malgré plusieurs avancées, la compréhension des voies de signalisation cellulaire impliquées dans la réplication du VIH est encore limitée. Notre objectif est d'identifier les mécanismes moléculaires de la résistance versus la permmissivité au VIH dans les cellules Th1 vs Th17.

**Méthodes:** Des études avec des biopuces (technologie Affymetrix) ont été réalisées pour comparer l'expression des cellules TH1 *versus* TH17 chez 4 donneurs non infectés par le VIH. Des analyses réalisées par *Gene Set Enrichment Analysis* et *Ingenuity Pathways Analysis* ont permis d'identifier des fonctions biologiques et des voies de signalisation différemment exprimées. L'expression différentielle des gènes d'intérêt a été confirmée par RT-PCR quantitative en temps réel et immunoblotage. Différentes molécules permettant l'activation des gènes d'intérêt, tel un ligand de PPAR $\gamma$  (rosiglitazone), ont été utilisés pour comparer les niveaux d'infection entre les cellules stimulées ou non par ces molécules. La réplication du VIH a été mesurée par quantification de l'ADN viral intégré par PCR en temps réel et mesure de la protéine p24 du VIH par ELISA.

**Résultats:** Des 38113 sondes détectées, 780 étaient exprimées dans les Th1/Th7 vs Th1 (p<0.05). Les analyses ont mis en évidence des différences d'expression de gènes jouant un rôle dans la migration endothéliale, l'inflammation, la différenciation des cellules T, l'apoptose et la dégradation protéasomale. Nous avons confirmé l'expression différentielle de certains gènes dans les cellules Th1 (e.g., SERPINE6, PTK2) versus Th1/Th7 (e.g., CXCR6, PPAR $\gamma$ ). Finalement, nous avons démontré que l'activation de la voie PPAR $\gamma$  induit la diminution de la réplication du VIH dans les cellules T CD4+.

**Conclusion:** Nous avons identifié des différences dans la régulation de diverses fonctions biologiques permettant en partie d'expliquer la susceptibilité à l'infection par le VIH dans les cellules T CD4+. Nous avons identifié la voie PI3K comme un régulateur négatif de la réplication du VIH, probablement en interférant avec la polarisation Th17. Ces études ont le potentiel de suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour interférer avec la réplication du VIH dans les lymphocytes T.

## RÉSUMÉ

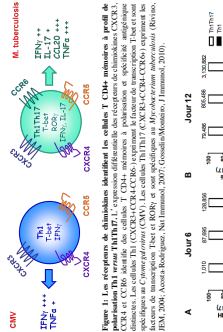
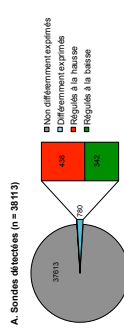
**Introduction:** Notre laboratoire a démontré que les cellules Th1 à phénotype CXCR3+CCR6- sont relativement résistantes et que les cellules Th17 ont un phénotype CXCR3+CCR6+ sans traitement permissives par le VIH-1. La réplication du VIH dépend d'une infection par le VIH-1. La réplication du VIH dépend de facteurs cellulaires agissant à différentes étapes du cycle viral. Malgré plusieurs avancées, la compréhension des voies de signalisation cellulaire impliquées dans la réplication du VIH est encore limitée. Notre objectif est d'identifier les mécanismes moléculaires de la résistance *versus* la permisivité au VIH dans les cellules Th1 *vs* Th17.

**Méthodes:** Des études avec des biopuces (technologie Affymetrix) ont été réalisées pour comparer l'expression des cellules TH1 *versus* TH17 chez 4 donneurs non infectés par le VIH. Des analyses réalisées par *Gene Set Enrichment Analysis* et *Ingenuity Pathways Analysis* ont permis d'identifier des fonctions biologiques et des voies de signalisation différemment exprimées. L'expression différentielle des gènes d'intérêt a été confirmée par RT-PCR quantitative en temps réel et immunoblotage. Différentes molécules permettant l'activation des gènes d'intérêt, tel un ligand de PPAR $\gamma$  (rosiglitazone), ont été utilisés pour comparer les niveaux d'infection entre les cellules stimulées ou non par ces molécules. La réplication du VIH a été mesurée par quantification de l'ADN viral intégré par PCR en temps réel et mesure de la protéine p24 du VIH par ELISA.

**Résultats:** Des 38113 sondes détectées, 780 étaient exprimées dans les Th1/Th7 vs Th1 (p<0.05). Les analyses ont mis en évidence des différences d'expression de gènes jouant un rôle dans la migration endothéliale, l'inflammation, la différenciation des cellules T, l'apoptose et la dégradation protéasomale. Nous avons confirmé l'expression différentielle de certains gènes dans les cellules Th1 (e.g., SERPINE6, PTK2) versus Th1/Th7 (e.g., CXCR6, PPAR $\gamma$ ). Finalement, nous avons démontré que l'activation de la voie PPAR $\gamma$  induit la diminution de la réplication du VIH dans les cellules T CD4+.

**Conclusion:** Nous avons identifié des différences dans la régulation de diverses fonctions biologiques permettant en partie d'expliquer la susceptibilité à l'infection par le VIH dans les cellules T CD4+. Nous avons identifié la voie PI3K comme un régulateur négatif de la réplication du VIH, probablement en interférant avec la polarisation Th17. Ces études ont le potentiel de suggérer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour interférer avec la réplication du VIH dans les lymphocytes T.

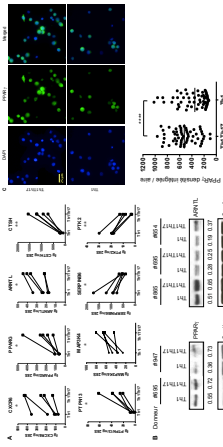
## RÉSULTATS

[illegible]

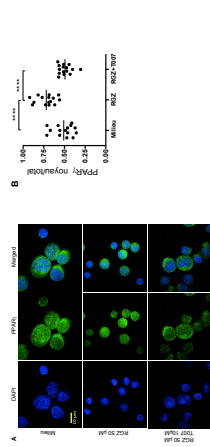
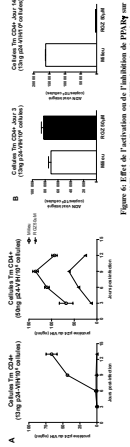
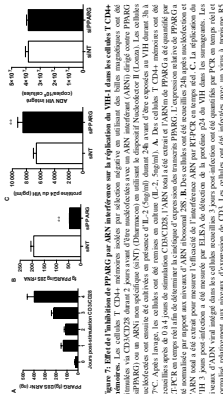
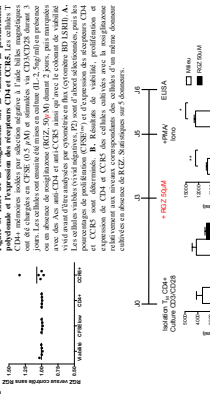
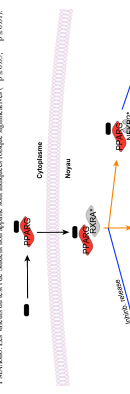
T111 - 27 days post-infection			
Cell Line	Log10 TCID50 (10 <sup>6</sup> cells)	Log10 TCID50 (10 <sup>6</sup> cells)	Log10 TCID50 (10 <sup>6</sup> cells)
MDCK	0.00	0.00	0.00
MDCK-2	0.00	0.00	0.00
MDCK-28	0.00	0.00	0.00
MDCK-3	0.00	0.00	0.00
MDCK-4	0.00	0.00	0.00
MDCK-5	0.00	0.00	0.00
MDCK-6	0.00	0.00	0.00
MDCK-7	0.00	0.00	0.00
MDCK-8	0.00	0.00	0.00
MDCK-9	0.00	0.00	0.00
MDCK-10	0.00	0.00	0.00
MDCK-11	0.00	0.00	0.00
MDCK-12	0.00	0.00	0.00
MDCK-13	0.00	0.00	0.00
MDCK-14	0.00	0.00	0.00
MDCK-15	0.00	0.00	0.00
MDCK-16	0.00	0.00	0.00
MDCK-17	0.00	0.00	0.00
MDCK-18	0.00	0.00	0.00
MDCK-19	0.00	0.00	0.00
MDCK-20	0.00	0.00	0.00
MDCK-21	0.00	0.00	0.00
MDCK-22	0.00	0.00	0.00
MDCK-23	0.00	0.00	0.00
MDCK-24	0.00	0.00	0.00
MDCK-25	0.00	0.00	0.00
MDCK-26	0.00	0.00	0.00
MDCK-27	0.00	0.00	0.00
MDCK-28	0.00	0.00	0.00
MDCK-29	0.00	0.00	0.00
MDCK-30	0.00	0.00	0.00
MDCK-31	0.00	0.00	0.00
MDCK-32	0.00	0.00	0.00
MDCK-33	0.00	0.00	0.00
MDCK-34	0.00	0.00	0.00
MDCK-35	0.00	0.00	0.00
MDCK-36	0.00	0.00	0.00
MDCK-37	0.00	0.00	0.00
MDCK-38	0.00	0.00	0.00
MDCK-39	0.00	0.00	0.00
MDCK-40	0.00	0.00	0.00
MDCK-41	0.00	0.00	0.00
MDCK-42	0.00	0.00	0.00
MDCK-43	0.00	0.00	0.00
MDCK-44	0.00	0.00	0.00
MDCK-45	0.00	0.00	0.00
MDCK-46	0.00	0.00	0.00
MDCK-47	0.00	0.00	0.00
MDCK-48	0.00	0.00	0.00
MDCK-49	0.00	0.00	0.00
MDCK-50	0.00	0.00	0.00
MDCK-51	0.00	0.00	0.00
MDCK-52	0.00	0.00	0.00
MDCK-53	0.00	0.00	0.00
MDCK-54	0.00	0.00	0.00
MDCK-55	0.00	0.00	0.00
MDCK-56	0.00	0.00	0.00
MDCK-57	0.00	0.00	0.00
MDCK-58	0.00	0.00	0.00
MDCK-59	0.00	0.00	0.00
MDCK-60	0.00	0.00	0.00
MDCK-61	0.00	0.00	0.00
MDCK-62	0.00	0.00	0.00
MDCK-63	0.00	0.00	0.00
MDCK-64	0.00	0.00	0.00
MDCK-65	0.00	0.00	0.00
MDCK-66	0.00	0.00	0.00
MDCK-67	0.00	0.00	0.00
MDCK-68	0.00	0.00	0.00
MDCK-69	0.00	0.00	0.00
MDCK-70	0.00	0.00	0.00
MDCK-71	0.00	0.00	0.00
MDCK-72	0.00	0.00	0.00
MDCK-73	0.00	0.00	0.00
MDCK-74	0.00	0.00	0.00
MDCK-75	0.00	0.00	0.00
MDCK-76	0.00	0.00	0.00
MDCK-77	0.00	0.00	0.00
MDCK-78	0.00	0.00	0.00
MDCK-79	0.00	0.00	0.00
MDCK-80	0.00	0.00	0.00
MDCK-81	0.00	0.00	0.00
MDCK-82	0.00	0.00	0.00
MDCK-83	0.00	0.00	0.00
MDCK-84	0.00	0.00	0.00
MDCK-85	0.00	0.00	0.00
MDCK-86	0.00	0.00	0.00
MDCK-87	0.00	0.00	0.00
MDCK-88	0.00	0.00	0.00
MDCK-89	0.00	0.00	0.00
MDCK-90	0.00	0.00	0.00
MDCK-91	0.00	0	



**Remerciements :** Les auteurs remercient Laurence Lejeune (Plateforme de cytométrie en flux) pour son expertise et son support technique dans les analyses et les tris par cytométrie en flux, ainsi que les membres de l'équipe de biochimie et de biophysique des protéines pour leurs conseils et leurs commentaires éclairés, ainsi que Mario Legault, Maryse Laineuse, et Véronique Gauthier pour leur aide technique.



**Figure 4. Validation de l'expression différentielle des gènes d'intérêt dans les cellules THP1/T<sub>H</sub>17.** Les cellules THP1/T<sub>H</sub>17 ont été traitées avec des cellules T régulatrices ou non traitées avec des cellules T régulatrices pendant 48 heures. Les gènes d'intérêt ont été analysés par RT-PCR. Les données ont été analysées par la méthode de Brinkman. Les gènes d'intérêt sont les suivants : *CTLA4*, *CTLA4-IT1*, *CTLA4-IT2*, *CTLA4-IT3*, *CTLA4-IT4*, *CTLA4-IT5*, *CTLA4-IT6*, *CTLA4-IT7*, *CTLA4-IT8*, *CTLA4-IT9*, *CTLA4-IT10*, *CTLA4-IT11*, *CTLA4-IT12*, *CTLA4-IT13*, *CTLA4-IT14*, *CTLA4-IT15*, *CTLA4-IT16*, *CTLA4-IT17*, *CTLA4-IT18*, *CTLA4-IT19*, *CTLA4-IT20*, *CTLA4-IT21*, *CTLA4-IT22*, *CTLA4-IT23*, *CTLA4-IT24*, *CTLA4-IT25*, *CTLA4-IT26*, *CTLA4-IT27*, *CTLA4-IT28*, *CTLA4-IT29*, *CTLA4-IT30*, *CTLA4-IT31*, *CTLA4-IT32*, *CTLA4-IT33*, *CTLA4-IT34*, *CTLA4-IT35*, *CTLA4-IT36*, *CTLA4-IT37*, *CTLA4-IT38*, *CTLA4-IT39*, *CTLA4-IT40*, *CTLA4-IT41*, *CTLA4-IT42*, *CTLA4-IT43*, *CTLA4-IT44*, *CTLA4-IT45*, *CTLA4-IT46*, *CTLA4-IT47*, *CTLA4-IT48*, *CTLA4-IT49*, *CTLA4-IT50*, *CTLA4-IT51*, *CTLA4-IT52*, *CTLA4-IT53*, *CTLA4-IT54*, *CTLA4-IT55*, *CTLA4-IT56*, *CTLA4-IT57*, *CTLA4-IT58*, *CTLA4-IT59*, *CTLA4-IT60*, *CTLA4-IT61*, *CTLA4-IT62*, *CTLA4-IT63*, *CTLA4-IT64*, *CTLA4-IT65*, *CTLA4-IT66*, *CTLA4-IT67*, *CTLA4-IT68*, *CTLA4-IT69*, *CTLA4-IT70*, *CTLA4-IT71*, *CTLA4-IT72*, *CTLA4-IT73*, *CTLA4-IT74*, *CTLA4-IT75*, *CTLA4-IT76*, *CTLA4-IT77*, *CTLA4-IT78*, *CTLA4-IT79*, *CTLA4-IT80*, *CTLA4-IT81*, *CTLA4-IT82*, *CTLA4-IT83*, *CTLA4-IT84*, *CTLA4-IT85*, *CTLA4-IT86*, *CTLA4-IT87*, *CTLA4-IT88*, *CTLA4-IT89*, *CTLA4-IT90*, *CTLA4-IT91*, *CTLA4-IT92*, *CTLA4-IT93*, *CTLA4-IT94*, *CTLA4-IT95*, *CTLA4-IT96*, *CTLA4-IT97*, *CTLA4-IT98*, *CTLA4-IT99*, *CTLA4-IT100*, *CTLA4-IT101*, *CTLA4-IT102*, *CTLA4-IT103*, *CTLA4-IT104*, *CTLA4-IT105*, *CTLA4-IT106*, *CTLA4-IT107*, *CTLA4-IT108*, *CTLA4-IT109*, *CTLA4-IT110*, *CTLA4-IT111*, *CTLA4-IT112*, *CTLA4-IT113*, *CTLA4-IT114*, *CTLA4-IT115*, *CTLA4-IT116*, *CTLA4-IT117*, *CTLA4-IT118*, *CTLA4-IT119*, *CTLA4-IT120*, *CTLA4-IT121*, *CTLA4-IT122*, *CTLA4-IT123*, *CTLA4-IT124*, *CTLA4-IT125*, *CTLA4-IT126*, *CTLA4-IT127*, *CTLA4-IT128*, *CTLA4-IT129*, *CTLA4-IT130*, *CTLA4-IT131*, *CTLA4-IT132*, *CTLA4-IT133*, *CTLA4-IT134*, *CTLA4-IT135*, *CTLA4-IT136*, *CTLA4-IT137*, *CTLA4-IT138*, *CTLA4-IT139*, *CTLA4-IT140*, *CTLA4-IT141*, *CTLA4-IT142*, *CTLA4-IT143*, *CTLA4-IT144*, *CTLA4-IT145*, *CTLA4-IT146*, *CTLA4-IT147*, *CTLA4-IT148*, *CTLA4-IT149*, *CTLA4-IT150*, *CTLA4-IT151*, *CTLA4-IT152*, *CTLA4-IT153*, *CTLA4-IT154*, *CTLA4-IT155*, *CTLA4-IT156*, *CTLA4-IT157*, *CTLA4-IT158*, *CTLA4-IT159*, *CTLA4-IT160*, *CTLA4-IT161*, *CTLA4-IT162*, *CTLA4-IT163*, *CTLA4-IT164*, *CTLA4-IT165*, *CTLA4-IT166*, *CTLA4-IT167*, *CTLA4-IT168*, *CTLA4-IT169*, *CTLA4-IT170*, *CTLA4-IT171*, *CTLA4-IT172*, *CTLA4-IT173*, *CTLA4-IT174*, *CTLA4-IT175*, *CTLA4-IT176*, *CTLA4-IT177*, *CTLA4-IT178*, *CTLA4-IT179*, *CTLA4-IT180*, *CTLA4-IT181*, *CTLA4-IT182*, *CTLA4-IT183*, *CTLA4-IT184*, *CTLA4-IT185*, *CTLA4-IT186*, *CTLA4-IT187*, *CTLA4-IT188*, *CTLA4-IT189*, *CTLA4-IT190*, *CTLA4-IT191*, *CTLA4-IT192*, *CTLA4-IT193*, *CTLA4-IT194*, *CTLA4-IT195*, *CTLA4-IT196*, *CTLA4-IT197*, *CTLA4-IT198*, *CTLA4-IT199*, *CTLA4-IT200*, *CTLA4-IT201*, *CTLA4-IT202*, *CTLA4-IT203*, *CTLA4-IT204*, *CTLA4-IT205*, *CTLA4-IT206*, *CTLA4-IT207*, *CTLA4-IT208*, *CTLA4-IT209*, *CTLA4-IT210*, *CTLA4-IT211*, *CTLA4-IT212*, *CTLA4-IT213*, *CTLA4-IT214*, *CTLA4-IT215*, *CTLA4-IT216*, *CTLA4-IT217*, *CTLA4-IT218*, *CTLA4-IT219*, *CTLA4-IT220*, *CTLA4-IT221*, *CTLA4-IT222*, *CTLA4-IT223*, *CTLA4-IT224*, *CTLA4-IT225*, *CTLA4-IT226*, *CTLA4-IT227*, *CTLA4-IT228*, *CTLA4-IT229*, *CTLA4-IT230*, *CTLA4-IT231*, *CTLA4-IT232*, *CTLA4-IT233*, *CTLA4-IT234*, *CTLA4-IT235*, *CTLA4-IT236*, *CTLA4-IT237*, *CTLA4-IT238*, *CTLA4-IT239*, *CTLA4-IT240*, *CTLA4-IT241*, *CTLA4-IT242*, *CTLA4-IT243*, *CTLA4-IT244*, *CTLA4-IT245*, *CTLA4-IT246*, *CTLA4-IT247*, *CTLA4-IT248*, *CTLA4-IT249*, *CTLA4-IT250*, *CTLA4-IT251*, *CTLA4-IT252*, *CTLA4-IT253*, *CTLA4-IT254*, *CTLA4-IT255*, *CTLA4-IT256*, *CTLA4-IT257*, *CTLA4-IT258*, *CTLA4-IT259*, *CTLA4-IT260*, *CTLA4-IT261*, *CTLA4-IT262*, *CTLA4-IT263*, *CTLA4-IT264*, *CTLA4-IT265*, *CTLA4-IT266*, *CTLA4-IT267*, *CTLA4-IT268*, *CTLA4-IT269*, *CTLA4-IT270*, *CTLA4-IT271*, *CTLA4-IT272*, *CTLA4-IT273*, *CTLA4-IT274*, *CTLA4-IT275*, *CTLA4-IT276*, *CTLA4-IT277*, *CTLA4-IT278*, *CTLA4-IT279*, *CTLA4-IT280*, *CTLA4-IT281*, *CTLA4-IT282*, *CTLA4-IT283*, *CTLA4-IT284*, *CTLA4-IT285*, *CTLA4-IT286*, *CTLA4-IT287*, *CTLA4-IT288*, *CTLA4-IT289*, *CTLA4-IT290*, *CTLA4-IT291</*

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

**Remerciements :** Les auteurs remercient Laurence Lejeune (Plateforme de cytométrie en flux, CRCHUM, Hôpital Saint-Luc, Montréal, QC, Canada) pour son expertise et son support technique dans les analyses et les tests par cytométrie en flux. Anne Vassal pour son aide dans l'obtention des approbations éthiques et des consentements éclairés, ainsi que Mario Legault, Maryse Lussier, et Véronique Lafontaine pour la gestion des cohortes de patients infectés.

**Support financier :** Ce travail est supporté en partie par des subventions accordées à Pétronelle Anctan des *Instituts de Recherche en Santé du Canada* (IRSC; MOP-2349) et du *MOP-114957*; *Fondation du CHUM, Fonds de la Recherche en Santé Québec* (FRSQ); ainsi que l'*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (INSERM), l'*Agence Nationale de Recherche sur le SIDA* (ANRS), et la *Fondation de France*. PA est supportée par des bourses du nouveau chercheur (*New Investigator Award*) du *FRSQ* (MOP-2349).